

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ

### Η ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ

ΤΗΣ ΕΛΑΦΡΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ 2 (MLC2) ΤΗΣ ΜΥΟΣΙΝΗΣ

ΣΤΟ ΤΕΛΕΟΣΤΕΟ *Sparus Aurata* (L.) ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΚΟΛΑΨΗ ΜΕΧΡΙ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ

ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΣΗ



ΚΑΦΦΕ ΕΛΕΑΝΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2004-2005



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 4290/1

Ημερ. Εισ.: 25-01-2005

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΚΑΦ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075019

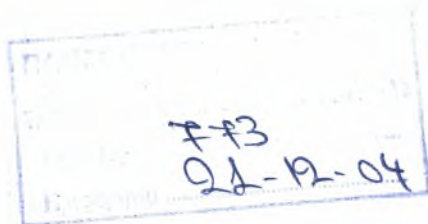
Η παρούσα διπλωματική διεξήχθη στο Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου *Algarve* της Πορτογαλίας κατά την παραμονή μου ως φοιτήτρια *Erasmus* το χρονικό διάστημα Μαρτίου-Μαΐου. Η επιβλέπουσα καθηγήτρια του πειράματος ήταν η κ. Deborah M. Power Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου *Algarve*. Υπεύθυνη της παρούσης διπλωματικής είναι η Επίκουρος Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Αικατερίνη Μούτου.

Ευχαριστώ θερμά την κ. D.M. Power που με δέχτηκε στο εργαστήριο της καθώς και για όλη την βοήθεια και την υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος. Την ευχαριστώ επίσης για όλα τα αναλώσιμα που μου διέθεσε για την διεξαγωγή του πειράματος. Ευχαριστώ επίσης το προσωπικό του εργαστηρίου του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου *Algarve* για την βοήθεια που μου παρείχε.

Ευχαριστώ ολόθερμα την κ. Α. Μούτου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να με επιλέξει παρέχοντας μου έτσι την δυνατότητα να μεταβώ στο εκεί Πανεπιστήμιο για την διεξαγωγή της διπλωματικής. Την ευχαριστώ επίσης για την κατανόηση και την βοήθεια που μου παρείχε για την αναγνώριση της διπλωματικής. Για αυτό το θέμα ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη της Γενικής Συνέλευσης και ειδικά τον Πρόεδρο της Γενικής Συνέλευσης και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη.

Θέλω να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη της υπεύθυνης τριμελούς επιτροπής που θα επιμεληθούν την εξέταση την διπλωματική μου, τον κ. Ζήση Μαμούρη Αναπληρωτή Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, την κ. Αικατερίνη Μούτου Επίκουρο Καθηγήτρια και τον κ. Κώνσταντινο Σταθόπουλο Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας με Έμφαση στην Μεταβολική Ρύθμιση.

Η φοιτήτρια του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας  
Καφφέ Ελεάννα



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	3
----------------	---

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΣ ΜΥΣ

1.1.1. Δομή μυός. ....	4
1.1.2. Μυοσίνη. ....	6
1.1.3. Ελαφριές αλυσίδες μυοσίνης. ....	7
1.1.4. Προέλευση μυός. ....	9
1.1.5. Δημιουργία και ανάπτυξη μυός. ....	10

### 1.2 Ψάρια

1.2.1. Ανάπτυξη του μυϊκού συστήματος. ....	11
1.2.2. Οργάνωση του μυϊκού συστήματος. ....	14
1.2.3. Χαρακτηριστικά μυϊκών ινών. ....	15

### 1.3 Τσιπούρα

1.3.1. Γενικά. ....	17
---------------------	----

### 1.4 Σκοπός της εργασίας. ....

17
----

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Καλλιέργεια και συλλογή προνυμφών και ιχθυδίων. ....	18
2.2 Επεξεργασία Δειγμάτων. ....	18
2.3 Χρώση Αιματοξυλίνης-Εωσίνης. ....	19
2.4 Μελέτη της έκφρασης της MLC2. ....	20
2.4.1. Δημιουργία Ριβοανιχνευτή. ....	20
2.4.2. Υβριδοποίηση <i>In-Situ</i> . ....	24

## 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ. ....

25
----

## 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ. ....

32
----

## 5.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

- Παράρτημα 1. .... 38
- Παράρτημα 2. .... 45

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το παρών πείραμα περιγράφει την οντογένεση της ελαφριάς αλυσίδας 2 (MLC2) της μυοσίνης στα αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας από την εκκόλαψη (4 ημέρες) μέχρι και μετά την μεταμόρφωση (80 ημέρες). Η μελέτη της έκφρασης έγινε με εφαρμογή της υβριδοποίησης *in situ* στους κατάλληλα προετοιμασμένα ιστούς σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Ο κλώνος για την δημιουργία του αντινοσηματικού ριβοανιχνευτή απομονώθηκε από τα προνυμφικά στάδια του ιππόγλωσσου. Ο ριβοανιχνευτής της MLC2 δημιουργήθηκε με μετασχηματισμό από βακτήρια και σημάνθηκε με διγοξιγενίνη. Μετά την υβριδοποίηση του ριβοανιχνευτή με τον ιστό, το μόριο αναφοράς ανιχνεύθηκε ανοσοιστοχημικά. Η υβριδοποίηση *in situ* αποκάλυψε ότι το συγκεκριμένο μετάγραφο εκφράζεται μόνο στις άσπρες μυϊκές ίνες και ότι είναι μια εμβρυϊκή ισομορφή που προοδευτικά αντικαθίσταται από κάποια άλλη ενήλικη ισομορφή μετά την μεταμόρφωση. Συγκεκριμένα, το πρότυπο έκφρασης ακολουθεί το πρότυπο της ανάπτυξης των μυϊκών ινών: η MLC2 εκφράζεται στις νεοδημιουργηθέντες μυϊκές ίνες, η έκφραση είναι έντονη μέχρι το στάδιο της ολοκλήρωσης της σωματογέννεσης (στάδιο μεταμόρφωσης) και μετά εξασθενίζει.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

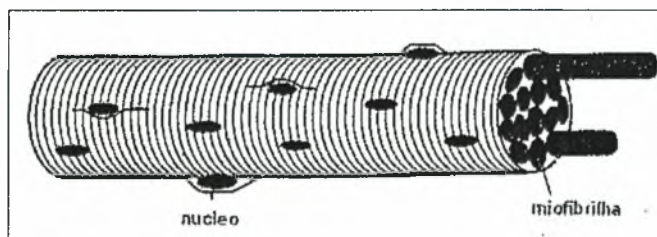
Ο μυς είναι ένας ιεραρχικός ιστός που γεννά και μεταδίδει ενέργεια. Είναι υπεύθυνος για όλες τις μηχανικές λειτουργίες του οργανισμού όπως είναι η κίνηση του σκελετού, η λειτουργία των αιμοφόρων αγγείων, της καρδιάς και των υπολοίπων οργάνων. Στα σπονδυλωτά οι μύες κατέχουν το 40-50 % του σωματικού βάρους.

Οι μύες βρίσκονται στον σκελετό του σώματος (σκελετικοί μύες), στο μυοκάρδιο (καρδιακοί μύες) και στο τοίχωμα των σπλαχνικών οργάνων και των αιμοφόρων αγγείων (λείοι μύες). Οι μύες μπορούν να ταξινομηθούν σε γραμμωτούς, που βρίσκονται κάτω από την εκούσια κίνηση (σκελετικοί μύες) και λείους που η λειτουργία τους είναι ακούσια (μύες των σπλαχνικών οργάνων και των αιμοφόρων αγγείων). Ο καρδιακός μυς λειτουργεί αυτόματα και ρυθμικά και επιπλέον δέχεται νευρικές ίνες από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (Guyton A.G.,1992).

### 1.1 ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΣ ΜΥΣ

#### 1.1.1 ΔΟΜΗ ΜΥΟΣ

Ο μυς αποτελείται από πολυπύρρηνα κύτταρα τα οποία περιβάλλονται από μια ηλεκτρικά διεγερσιμη κυτταρική μεμβράνη που καλείται σαρκείλημα. Τα πολυπύρρηνα κύτταρα κατά την ανάπτυξη προέρχονται από την συγχώνευση αρκετών μονοπύρηνων κυττάρων. Ένα μυϊκό κύτταρο αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό μυϊκών ινών, παράλληλων μεταξύ τους, διαμέτρου 0,01 mm και μήκους αρκετών εκατοστών. Οι μυϊκές ίνες είναι βουτηγμένες μέσα στο κυτταρόπλασμα που καλείται σαρκόπλασμα, το οποίο είναι πλούσιο σε γλυκογόνο, ATP, φωσφοκρεατίνη και γλυκολυτικά ένζυμα (Stryer L.,1997) και περιέχει ένα εκτεταμένο σύστημα διάτρητων μεμβρανών που καλείται σαρκοπλασματικό δίκτυο. Η κάθε μυϊκή ίνα με την σειρά της αποτελείται από αρκετά μυοϊνίδια διαμέτρου 1 μm το καθένα, που αποτελούν το συστατικό τμήμα της μυϊκής ίνας (εικόνα 1).

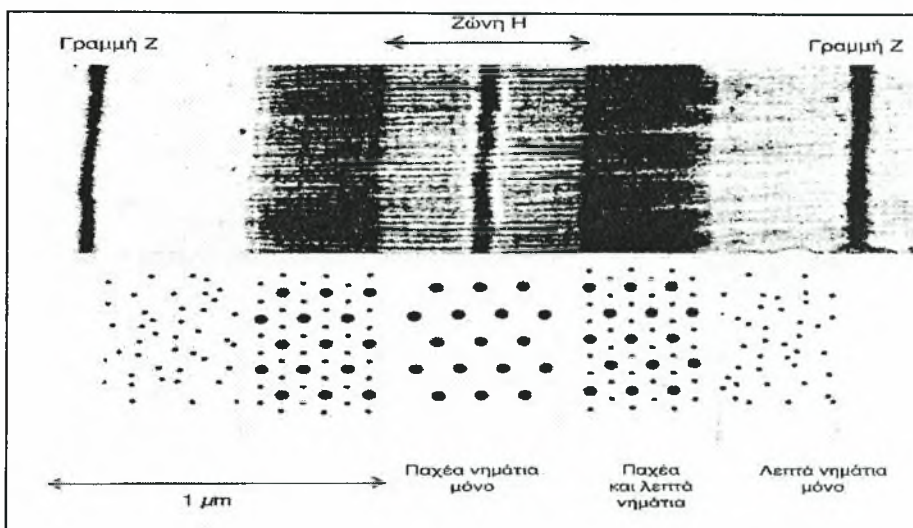


Εικόνα 1: Σχηματικό διάγραμμα μιας μυϊκής ίνας (Alberts et al.,1994)



Σε κάθε μυϊκό ινίδιο διακρίνονται διαδοχικές εγκάρσιες σκοτεινές και φωτεινές γραμμώσεις. Το μήκος των σκοτεινών τμημάτων είναι σταθερό, ενώ το μήκος των φωτεινών τμημάτων αυξομειώνεται ανάλογα με την λειτουργική κατάσταση (σύσπαση-χάλαση) των μυϊκών ινιδίων. Κάθε φωτεινό τμήμα φέρει στο μέσο μια λεπτή σκοτεινή γραμμή (γραμμή Z). Το τμήμα του μυϊκού ινιδίου που εκτείνεται ανάμεσα σε δύο συνεχόμενες γραμμές Z καλείται σαρκομερίδιο και επαναλαμβάνεται κάθε 2,3  $\mu\text{m}$  κατά μήκος του άξονα του ινιδίου. Το σαρκομερίδιο (εικόνα 2) είναι η λειτουργική μονάδα του μυϊκού ινιδίου.

Μέσα σε κάθε μυϊκό ινίδιο υπάρχουν κατά μήκος δύο ειδών μυϊκά νημάτια. Τα λεπτά νημάτια διαμέτρου 0,005 $\mu\text{m}$  και μήκους 1,5  $\mu\text{m}$  το καθένα και τα παχέα νημάτια διαμέτρου 0,01  $\mu\text{m}$ . Τα παχέα νημάτια βρίσκονται στο κέντρο του σαρκομεριδίου (σκοτεινά τμήματα), ενώ τα λεπτά νημάτια (φωτεινά τμήματα) εκτείνονται από την γραμμή Z και προς τις δύο κατευθύνσεις μέσα στο σαρκομερίδιο (το ένα άκρο τους προσφύεται στην γραμμή Z, ενώ το άλλο άκρο είναι ελεύθερο και απολήγει ανάμεσα στα παχέα μυϊκά νημάτια) (Stryer L.,1997).



Εικόνα 2: Ηλεκτρονιομικρογραφία μιας επιμήρους τομής μυοϊνιδίου σκελετικού μυός. Διακρίνεται ένα σαρκομερίδιο. Κάτω από το μικρογράφημα απεικονίζεται μια σχηματική αναπαράσταση της εγκάρσιας τομής μυοϊνιδίου (Stryer L.,1997).

Το παχύ νημάτιο αποτελείται κυρίως από μυοσίνη, ενώ το λεπτό νημάτιο περιέχει ακτίνη, τροπομυοσίνη και τροπονίνη. Στην γραμμή Z είναι παρούσα η α-ακτινίνη και γύρω από τα νημάτια σχηματίζεται ένα ευέλικτο πλέγμα από την τινίνη και την νεμπουλίνη. Άλλες πρωτεΐνες που απαντούν στα μυϊκά ινίδια είναι η δεσπίνη, η φιλλαμίνη, η γκελσολίνη, η C-πρωτεΐνη, η M-πρωτεΐνη και η κρεατοκινάση .

Από τις πρωτεΐνες των νημάτων, η ακτίνη και η μυοσίνη είναι τα μόρια που δημιουργούν την δύναμη της συστολής. Η τροπονίνη και η τροπομυοσίνη παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση ακτίνης και μυοσίνης (Σμοκοβίτη Α., 1999).

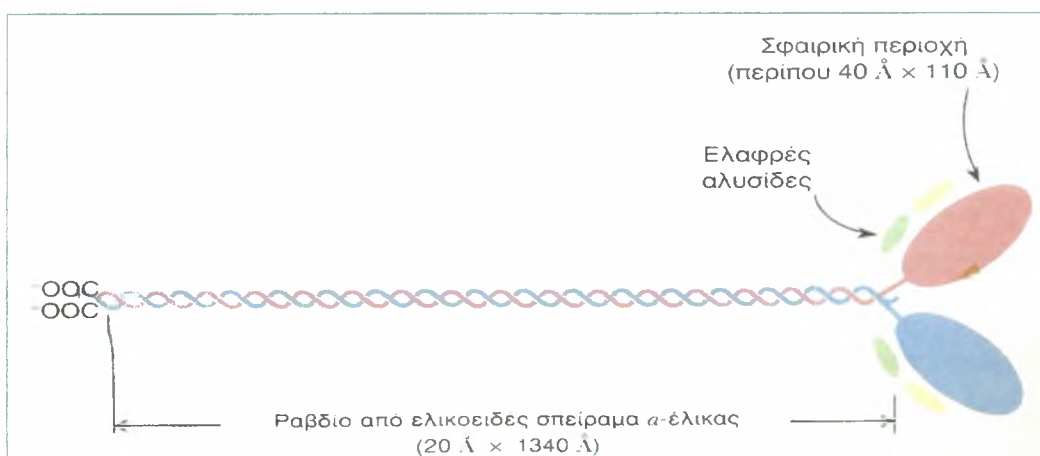
Κάθε παχύ νημάτιο περιβάλλεται από έξι λεπτά νημάτια (τρία στην κάθε άκρη). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των πλάγιων γεφυρών της μυοσίνης των παχέων νημάτων και των μονάδων ακτίνης των λεπτών νημάτων δημιουργεί την συσταλτική δύναμη του μυός. Κατά την μυϊκή συστολή τα παχέα και τα λεπτά νημάτια διολισθαίνουν το ένα πάνω στο άλλο με αποτέλεσμα ο μυς να βραχύνεται μέχρι το ένα τρίτο του αρχικού του μήκους (Alberts B. et al., 1994).

### 1.1.2. ΜΥΟΣΙΝΗ

Οι σκελετικοί μύες περιέχουν 70-100 mg μυοσίνης ανά g μυός. Αυτό αντιστοιχεί στο 40-50% της συνολικής μυϊκής πρωτεΐνης. Η μυοσίνη είναι διαλυτή σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και αδιάλυτη σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος.

Δομή : Η μυοσίνη (εικόνα 3) είναι ένα πολύ μεγάλο ασύμμετρο μόριο (540 kb) που σχηματίζεται από έξι πολυπεπτιδικές αλυσίδες: δύο όμοιες βαριές αλυσίδες (540 kb η καθεμία) και τέσσερις ελαφριές αλυσίδες (20 kb περίπου η καθεμία) (Stryer L., 1997). Το μόριο αποτελείται από μια σφαιρική περιοχή με διπλή κεφαλή η οποία συνδέεται με μια μακριά ουρά (1500 Å σε μήκος και 20 Å σε πλάτος). Η ουρά είναι μια διπλή α-έλικα που σχηματίζεται από τις βαριές αλυσίδες. Σε κάθε κεφαλή, δύο διαφορετικές ελαφριές αλυσίδες συνδέονται με την βαριά αλυσίδα.

Το νημάτιο της μυοσίνης είναι πολικό και οι δύο ομάδες των κεφαλών προσανατολίζονται προς αντίθετες κατευθύνσεις.



Εικόνα 3: Σχηματικό διάγραμμα ενός μορίου μυοσίνης (Stryer L., 1997).



Λειτουργία : Η μυοσίνη έχει τρεις σημαντικές βιολογικές δραστηριότητες: α) Τα μόρια της μυοσίνης, όταν βρεθούν σε ένα διάλυμα με φυσιολογική ιοντική ισχύ συγκρατούνται σε νημάτια, β) Συνδέεται με την πολυμερισμένη μορφή της ακτίνης (κύριο συστατικό των λεπτών νηματίων) μέσω των κεφαλών της. Η μια ομάδα των κεφαλών μετακινεί τα νημάτια της ακτίνης προς την μια κατεύθυνση, ενώ η άλλη ομάδα τα μετακινεί προς την αντίθετη. Αυτήν η αλληλεπίδραση παίζει βασικό ρόλο για την δημιουργία της δύναμης για την σχετική κίνηση των νηματίων και γ) Η μυοσίνη είναι ένα ένζυμο που έχει δράση ATPάσης (υδρολύει το ATP για την παραγωγή ενέργειας). Η δράση της εντοπίζεται στην κεφαλή της μυοσίνης. Η παραγωγή ενέργειας και η απελευθέρωση του ανόργανου φωσφορικού δίνουν την ώθηση για την αλλαγή της διαμόρφωσης της κεφαλής της μυοσίνης και την κίνηση (Stryer L., 1997).

### 1.1.3. ΕΛΑΦΡΙΕΣ ΑΛΥΣΙΔΕΣ ΜΥΟΣΙΝΗΣ

1.Κατηγορίες: Οι ελαφριές αλυσίδες ανήκουν στην οικογένεια των υπεργονιδίων της τροπονίνης C που περιλαμβάνουν επίσης τις πρωτεΐνες δέσμευσης του ασβεστίου καλμοδουλίνη και παρβαλβουμίνη (Periasamy M., et al., 1984). Η μυοσίνη στον γραμμωτό μύ των σπονδυλωτών περιέχει τρεις μορφές ελαφριών αλυσίδων. Αυτές είναι, η Ελαφριά αλυσίδα 1 της Μυοσίνης (MLC1) M.B 22 kb, η Ελαφριά αλυσίδα 2 της Μυοσίνης (MLC2) M.B 18 kb και η Ελαφριά αλυσίδα 3 της Μυοσίνης (MLC3) M.B 16 kb. Κάθε κεφαλή περιέχει μια MLC2 και μία από τις άλλες δύο (MLC1 ή MLC3). Οι ελαφριές αλυσίδες ανάλογα με τον τρόπο απομόνωσης διακρίνονται: α) Στις αλκαλικές (MLC1 και MLC3), που μπορούν να απομονωθούν μετά από κατεργασία της μυοσίνης με αλκάλι. Αυτά τα ισοένζυμα προέρχονται από το ίδιο γονίδιο με εναλλακτικό μάτισμα (Thiebaud P., et al., 2001) και β) Στις απομονωμένες μετά από κατεργασία με δινιτροβενζοϊκό οξύ αλυσίδες (MLC2). Η MLC2 έχει ρυθμιστικό αν όχι καταλυτικό ρόλο στην δέσμευση του ασβεστίου και γι αυτό και αναφέρεται και ως ρυθμιστική (Weeds A.G and Lowey S., 1971). Η δράση της εξαρτάται από την φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση της διπλασιάζει την ενεργοποιημένη από την ακτίνη δραστηριότητα ATPάσης της μυοσίνης και έτσι συμβάλλει στην συστολή. Η αποφωσφορυλίωση της από την φωσφατάση C προκαλεί την χάλαση του μυός.

Οι ελαφριές και οι βαριές αλυσίδες της μυοσίνης υπάρχουν σε αρκετές ισομορφές. Οι σκελετικοί μύες στα διάφορα θηλαστικά περιέχουν τεσσάρων ειδών ισομορφές της βαριάς αλυσίδας: την αργή ή β-MHC και τις τρεις γρήγορες IIa-, IIx- IIb-MHCs ισομορφές. Οι ελαφριές αλυσίδες υπάρχουν σε αρκετές ισομορφές. Οι πιο σημαντικές είναι η αργή MLC1s και οι δύο γρήγορες MLC1f και MLC3f (Schiaffino S. and Reggiani C., 1994).

2. Έκφραση ελαφριών αλυσίδων: Η έκφραση των ισομορφών είναι ιστοειδική και είναι διαφορετική στα διάφορα στάδια ανάπτυξης. Η έκφραση τους είναι κάτω από περιβαλλοντικό και ορμονικό έλεγχο (Whalen et al., 1981; Gauthier et al., 1982; Izumo et al., 1986; Hill et al., 2000). Για παράδειγμα, κάτω από την επίδραση θυροειδών ορμονών, οι ελαφριές αλυσίδες της μυοσίνης δείχνουν διαφορετικό τύπο έκφρασης στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης της ρυθμιστικής αλυσίδας αυξάνονται μετά από χορήγηση θυροειδών ορμονών, ενώ τα επίπεδα έκφρασης των αλκαλικών αλυσίδων δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτη μεταβολή (Moutou K., et al., 2001). Τα επίπεδα του mRNA των ισόμορφων των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης επηρεάζονται και από την θερμοκρασία. Συγκεκριμένα, μειώνονται σε υψηλές θερμοκρασίες και αυξάνονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Hirayama Y., et al., 1998).

Στα ανώτερα σπονδυλωτά το είδος της κυτταρικής σειράς των μυοβλαστών επηρεάζει επίσης αναπτυξιακά την έκφραση των ισομορφών της μυοσίνης. Η μυοσίνη που προέρχεται από τον πληθυσμό των μυοβλαστών που στηρίζει την υπερπλασία των άσπρων μυών του ιχθυδίου μετά την μεταμόρφωση, είναι διαφορετική από αυτήν που προέρχεται από τον πληθυσμό που δίνει γένεση στους επιφανειακούς μύες (Watabe S., 1999).

3. Πρότυπο έκφρασης κατά την ανάπτυξη: Μέχρι τώρα λίγα είναι γνωστά για το πρότυπο έκφρασης των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης κατά την ανάπτυξη. Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης εκφράζονται οι εμβρυονικές και οι εμβρυϊκές ισομορφές της μυοσίνης. Αργότερα κατά την ανάπτυξη, με την αναγέννηση των μυών αλλάζει και το είδος της ισόμορφης που εκφράζεται (Rowlerson A., et al., 1997). Καθώς τα κύτταρα των μυοτόμων αρχίζουν να συγχωνεύονται και να γίνονται πολυπύρρηνα εμφανίζονται επιπρόσθετες ισομορφές (Holland Z., et al., 1995). Γενικά οι μη-μυϊκές ισομορφές και οι εμβρυονικές ισομορφές εμφανίζονται πριν τις εμβρυϊκές και ενήλικες ισομορφές.

Όσον αφορά την MLC2, η αρχή της έκφρασης της συμπίπτει με την αρχή της οργανογένεσης (αυτό ίσως είναι μια ένδειξη της απουσίας εμβρυονικών μορφών αυτού του μεταγράφου). Με την ολοκλήρωση της οργανογένεσης, εμφανίζεται ένα δεύτερο μετάγραφο. Αρχικά, η MLC2 εκφράζεται στις άσπρες και κόκκινες μυϊκές ίνες, ενώ κατά την μεταμόρφωση και μετά τα μεταγράφα της εκφράζονται μόνο στις άσπρες μυϊκές ίνες (Moutou K., et al., 2001).

#### 1.1.4 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΜΥΟΣ

Στα σπονδυλωτά το κάθε είδος μύ (σκελετικός, καρδιακός και λείος) προέρχεται από διαφορετικό πρόδρομο κυτταρικό πληθυσμό. Ο καρδιακός μυς προέρχεται από κύτταρα του πρόσθιου πλευρικού μεσοδέρματος. Ο λείος μυς προέρχεται από ποικίλους τύπους προδρόμων κυττάρων, συμπεριλαμβάνοντας τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας και τα τοπικά μεσεγχυματικά κύτταρα που προέρχονται από το πλευρικό μεσόδερμα (Firulli B.A and Olson.N.E., 1997). Ενώ ο σκελετικός μυς προέρχεται από το αξονικό μεσόδερμα.

Όλοι οι σκελετικοί μύες προέρχονται από τους σωμίτες (κομμάτια του αξονικού μεσοδέρματος) εκτός από τους μύες της κεφαλής που προέρχονται από το κεφαλικό μεσόδερμα. Οι σωμίτες δημιουργούνται στις δυο πλευρές του νευρικού σωλήνα. Ραχιαία καλύπτονται από την επιφάνεια του εξωδέρματος και πλευρικά είναι σε επαφή με κύτταρα του ενδιάμεσου μεσοδέρματος. Η δημιουργία των μυών ξεκινά πριν την δημιουργία όλων των σωμιτών του κορμού, η διεύθυνση της είναι από το κεφάλι στην ουρά και εξαρτάται από την δράση των μυογεννετικών κυττάρων (McGrew M.J. and Pourquie O., 1998). Η σωμιτογένεση ξεκινά κατά την εμβρυογένεση και συνεχίζεται για αρκετές ημέρες μέχρι και μετά την γέννηση ανάλογα με το είδος του οργανισμού (Cossu G., et al., 1996).

Κάθε ζευγάρι σωμίτη υφίσταται μια διαδικασία ωρίμανσης που οδηγεί τελικά στην δημιουργία του αξονικού σκελετού και στους μύες των άκρων και του κορμού. Αρχικά οι σωμίτες είναι σφαίρες επιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλουν μια κεντρική κοιλότητα μεσεγχυματικών κυττάρων. Τα τελευταία μόλις δημιουργηθούν, διαφοροποιούνται ραχιαία στα επιθηλιακά κύτταρα της δερμομυοτόμου και κοιλιακά στα κύτταρα της σκληροτόμου (σε απάντηση από τα σήματα από τους παρακείμενους ιστούς). Η σκληροτόμος δίνει γένεση στο χόνδρο της σπονδυλικής στήλης, ενώ η δερμομυοτόμος είναι η πηγή των πρόδρομων μυϊκών κυττάρων.

Τα κύτταρα από το μεσοραχιαίο τμήμα των σωμιτών κοντά στον νευρικό σωλήνα μεταναστεύουν κάτω από την δερμομυοτόμο για να δημιουργήσουν την μυοτόμο. Αυτά τα κύτταρα γρήγορα γίνονται μετά-μιτωτικά (αποκτούν ατρακτοειδές σχήμα και δημιουργούν μυοειδικές πρωτεΐνες) και καλούνται μυοβλάστες (McGrew M.J. and Pourquie O., 1998)..

Οι κοιλιακοί μυοτόμοι αργότερα θα συνεισφέρουν στους πίσω μύες, που αναφέρονται και ως επάξιοι, ενώ το πλευρικό κομμάτι της δερμομυοτόμου θα μεταναστεύσει στο ένα άκρο και θα δημιουργήσει τους υπάξιους μύες. Ο συνδετικός ιστός των πίσω μυών και η δερμίδα που τα καλύπτει επίσης προέρχονται από τα κύτταρα της δερμομυοτόμου (Brent, A.V., and Tabin, C.J., 2002).

Οι μεσοδερμικοί προγεννήτορες δίνουν επιπλέον γέννεση σε ευδιάκριτες κυτταρικές σειρές, όπως τα μυοκύτταρα, τα οστεοκύτταρα και τα λιποκύτταρα (Koumans J.T.M and Akster H.A., 1995). Τα μυοκύτταρα είναι μυοβλάστες που συνενώνονται μεταξύ τους.

#### 1.1.5 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΛΑΣΗ ΜΥΟΣ

Η δημιουργία όλων των διαφοροποιημένων σκελετικών μυϊκών ινών οφείλεται στην δράση των μυοβλαστών και γίνεται σε δύο στάδια. Αρχικά στο έμβρυο (πρώτο στάδιο) οι νεοδημιουργούμενοι μυοβλάστες (εμβρυονικοί) συγχωνεύονται και δημιουργούν τους πρωταρχικούς μυοσωληνίσκους. Αργότερα στο νεογέννητο (δεύτερο στάδιο) οι αργότερα δημιουργούμενοι μυοβλάστες (εμβρυϊκοί) επικάθονται κατά μήκος των τοιχωμάτων των πρωταρχικών μυοσωληνίσκων (παίρνοντας σήματα από τις νεύρομυϊκές συνάψεις) πολλαπλασιάζονται και συγχωνεύονται για να δημιουργήσουν τους δευτερεύων μυοσωληνίσκους, που αποτελούν και την πλειοψηφία των μυϊκών ινών (Donoghue J.M. and Sanes R.J., 1994). Οι μυϊκές ίνες που δημιουργούνται είναι διαφοροποιημένες σε δομικά και λειτουργικά διαφορετικούς τύπους ινών (Patruno M et al., 1998).

Η ανάπτυξη του μυός (η δημιουργία νέων ινών και η ανάπτυξη των ήδη υπαρχόντων) στην διάρκεια της ζωής βασίζεται στους ενήλικες μυοβλάστες, που καλούνται δορυφορικά κύτταρα. Αυτό συμβαίνει γιατί τα ήδη δημιουργημένα μυϊκά κύτταρα, για να μπορέσουν να διατηρήσουν την εξειδικευμένη λειτουργία τους, έχουν χάσει την ικανότητα πολλαπλασιασμού.

Τα δορυφορικά κύτταρα συνιστούν ένα πληθυσμό πολλαπλασιαζόμενων μυοβλαστών που έχουν υποστεί τελική διαφοροποίηση. Πηγή τους είναι ένας πληθυσμός αδιαφοροποίητων μυοβλαστών (στελεχιαία μυϊκά κύτταρα). Εντοπίζονται ανάμεσα στο σαρκείλημα και την βασική λάμινα των πλήρως διαφοροποιημένων σκελετικών μυϊκών ινών.

Η μετά εμβρύου ανάπτυξη γίνεται μέσω δυο μηχανισμών, της υπερτροφίας και της υπερπλασίας. Στην υπερτροφία, τα παράγωγα κύτταρα (πολλαπλασιαζόμενοι μυοβλάστες) απορροφούνται μέσα στις υπάρχουσες μυϊκές ίνες για να διατηρηθεί μια σταθερή αναλογία πυρήνα προς κυτταρόπλασμα. Αντίθετα, στην υπερπλασία οι μυοβλάστες συγχωνεύονται μαζί στην επιφάνεια των μυϊκών ινών και δημιουργούν ένα νέο μυοσωληνίσκο που ωριμάζει σε μια νέα μυϊκή ίνα (Koumans J.T.M et al., 1994).

Η απόφαση του μυοβλάστη να αφήσει τον κυτταρικό κύκλο και να διαφοροποιηθεί εξαρτάται κυρίως από την οικογένεια των MyoD γονιδίων. Γενικά όμως η διαφοροποίηση των μυών είναι κάτω από τον έλεγχο πολύπλοκων σηματοδοτικών μονοπατιών από τους παρακείμενους ιστούς και ειδικά από την νωτοχορδή που δρα μαζί με παράγοντες από το εξώδερμα για να υποκινήσει την μεταγραφή μυογεννετικών μεταγραφικών παραγόντων (MRFs). Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι η οικογένεια της MyoD που περιλαμβάνει την μυογενίνη, τον myf5 και τον MyoD. Στην διαφοροποίηση σημαντικό ρόλο παίζει επίσης και η οικογένεια της γλυκοπρωτεΐνης Sonic Hedgehog (Molkentin J.D and Olson E.N., 1996).

## **2.ΨΑΡΙΑ**

Οι σκελετικοί μύες συνιστούν το 40-60% της μάζας του σώματος στα περισσότερα ψάρια. Στα ψάρια οι μεγάλοι μύες του κορμού και της ουράς χρησιμοποιούνται για το κολύμπι. Αυτοί αποτελούν και την πλειοψηφία της μυϊκής μάζας. Υπάρχουν βέβαια και οι μικροί μύες που βρίσκονται στην κεφαλή και στα πτερύγια. Αυτοί προέρχονται από τα μυοδιαφράγματα αλλά στα ενήλικα ψάρια δεν συνδέονται με τα κομμάτια του σώματος. Η μυϊκή μάζα δεν παίζει ρόλο μόνο στην προσαρμογή στη υδρόβια ζωή, αλλά χρησιμοποιείται και για την αποθήκευση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται για ένα αριθμό ενεργό-εξαρτώμενων δραστηριοτήτων (Weatherley A.H and Gill H.S., 1985).

### **2.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΥΪΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

Η ανάπτυξη του μυός στα ψάρια διαφέρει μετά τα στάδια της προνύμφης από εκείνη των θηλαστικών και των πουλιών. Στα τελευταία η αύξηση του αριθμού των μυϊκών ινών (υπερπλασία) σταματά λίγο μετά την γένεση και η περαιτέρω ανάπτυξη του μυός συμβαίνει κυρίως μέσω της υπερτροφίας (Goldspink G., 1972; Campion P.R., 1984).

Αντίθετα στα τελεόστεα ψάρια, η περαιτέρω ανάπτυξη των ήδη δημιουργηθέντων μυϊκών ινών γίνεται και με τους δύο μηχανισμούς (υπερπλασία, υπερτροφία). Αυτοί οι δύο μηχανισμοί συνεισφέρουν στην συνολική ανάπτυξη και διαφοροποίηση των πλευρικών μυών, που συνεχίζεται και κατά την διάρκεια του μεγαλύτερου μέρους του κύκλου της ζωής.

Η υπερπλαστική ανάπτυξη συμβαίνει κυρίως στα στάδια της προνύμφης. Σε αντίθεση η υπερτροφική διαδικασία συμβαίνει σε όλα τα στάδια, αλλά είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός της μυϊκής ανάπτυξης μόνο κατά την εφηβεία και την ενηλικίωση (Patruno M. et al., 1998).



Τα ψάρια επίσης δείχνουν εντονότερη ποικιλομορφία στην ανάπτυξη του μυός ως απάντηση στους περιβαλλοντικούς παράγοντες σε σχέση με τα θηλαστικά και τα πτηνά (Weatherley A.H.,1990, Meyer-Rochow V.B and Ingram J.R., 1993).

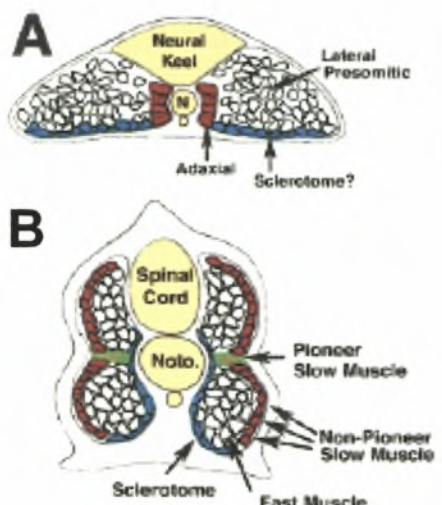
Συγκεκριμένα στα ψάρια, η ανάπτυξη του μυός εξαρτάται από την θερμοκρασία, την μεταχείριση με ορμόνες και από το είδος της θρέψης. Η θερμοκρασία επιδρά κυρίως στον ρυθμό της υπερπλασίας των μυοϊνιδίων και συγκεκριμένα, περισσότερο στο στάδιο της διανομής και της διαφοροποίησης των μυϊκών ινών από ότι στον ρυθμό αύξησής τους (Watabe S.,1999).

Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του μυός συμβαίνουν τρεις φάσεις υπερπλασίας α) Η "εμβρυονική" φάση (παρατηρείται στο έμβρυο) οδηγεί στην δημιουργία των εμβρυονικών μυϊκών ινών που είναι παρόντες την στιγμή της εκκόλαψης μαζί με ένα πληθυσμό αδιαφοροποίητων μυοβλαστών από τους οποίους θα προέλθουν όλες οι υπόλοιπες μυϊκές ίνες (η πηγή της μετέπειτα ανάπτυξης) β) Η "νυμφική" φάση (που παρατηρείται στην προνύμφη με το λεκιθικό σάκο) συνίσταται κυρίως από την στρατολόγηση νέων ινών στις ευδιάκριτες αναπαραγωγικές ζώνες στο ραχιαίο και κοιλιακό επιφανειακό στρώμα των άσπρων μυών. Αυτές οι ζώνες παρέχουν τους μυοβλάστες που θα δώσουν γένεση στις νέες μυϊκές ίνες στην διάρκεια του σταδίου της προνύμφης αλλά και στο πρώτο διάστημα της ενήλικης ζωής (Rowlerson A. et al.,1995). Σ' αυτό το στάδιο οι εσωτερικές άσπρες μυϊκές ίνες αναπτύσσονται με υπερπλασία αλλά και με υπερτροφία των υπαρχόντων μυϊκών ινών. γ) Η "έφηβη" φάση (ξεκινά από την προνύμφη που κολυμπά ελεύθερα και συνεχίζεται και κατά την διάρκεια της ενήλικης ζωής) εμπεριέχει την στρατολόγηση των μυοβλαστών που βρίσκονται στην επιφάνεια των εμβρυονικών μυϊκών ινών (Koumans J.T.M et al.,1994; Johnston J.A et al.,1995; Rowlerson A. et al.,1995). Συγκεκριμένα, η υπερπλαστική διαδικασία αποδίδεται στον πολλαπλασιασμό των δορυφορικών κυττάρων των βαθύτερων μυών ή στην μετανάστευση των προερχόμενων από το μεσέγγυμα πρόδρομων μυϊκών κυττάρων που εισέρχονται στα μυομερή από τα μυοδιαφράγματα.

Η εμβρυονική φάση εμπεριέχει δυο πληθυσμούς μυϊκών πρόδρομων κυττάρων στο segmental plate που αναπτύσσονται σε διαφορετικά κυτταρικά περιβάλλοντα και εκθέτουν διαφορετικές συμπεριφορές (Εικόνα 4) α). Τα αξονικά μυοκυττάρια (adaxial). Είναι κυβοειδή κύτταρα που βρίσκονται κοντά στην νωτοχορδή και εκφράζουν το MyoD. Μετά την δημιουργία των σωμιτών, τα αξονικά κύτταρα υπό την επίδραση της γλυκοπρωτεΐνης Sonic Hedgehog που εκκρίνεται από την νωτοχορδή (Blagden et al., 1997) μετακινούνται ακτινωτά μακριά από την νωτοχορδή και δημιουργούν το επιφανειακό στρώμα των μυών (κόκκινες μυϊκές ίνες). β) Τα κύτταρα του πλευρικού μεσοδέρματος που καλούνται πλευρικά προσωμιτικά κύτταρα (Devoto S.H., et al., 1996). Αυτά είναι μικρότερα σε μέγεθος, έχουν ακανόνιστο σχήμα και χωρίζονται από



την νωτοχορδή με τα αξονικά κύτταρα. Μέχρι και την δημιουργία των σωμιτών δεν εκφράζουν το Myo D. Από αυτά προέρχονται τα βαθύτερα στρώματα των άσπρων μυϊκών ινών.



Εικόνα 4: (Α) Σχηματική εγκάρσια τομή εμβρύου 13 ωρών του πρόσθιου psm. Δείχνεται η σχετική θέση των προγεννήτορων των γρήγορων μυϊκών ινών (lateral presomitic) και των αργών μυϊκών ινών (axial). (Β) Σχηματική εγκάρσια τομή εμβρύου 24 ωρών. Απεικονίζεται η σχετική θέση των τεσσάρων κυτταρικών τύπων. Τα αξονικά κύτταρα (κόκκινα) μετακινούνται αξονικά μακριά από την νωτοχορδή για να δημιουργήσουν ένα στρώμα επιφανειακών κυττάρων. Τα πλευρικά προσωμιτικά δεν μεταναστεύουν, αλλά διαφοροποιούνται σε μυϊκά κύτταρα που μένουν βαθιά μέσα στα μυομερή (Blagden et al., 1997).

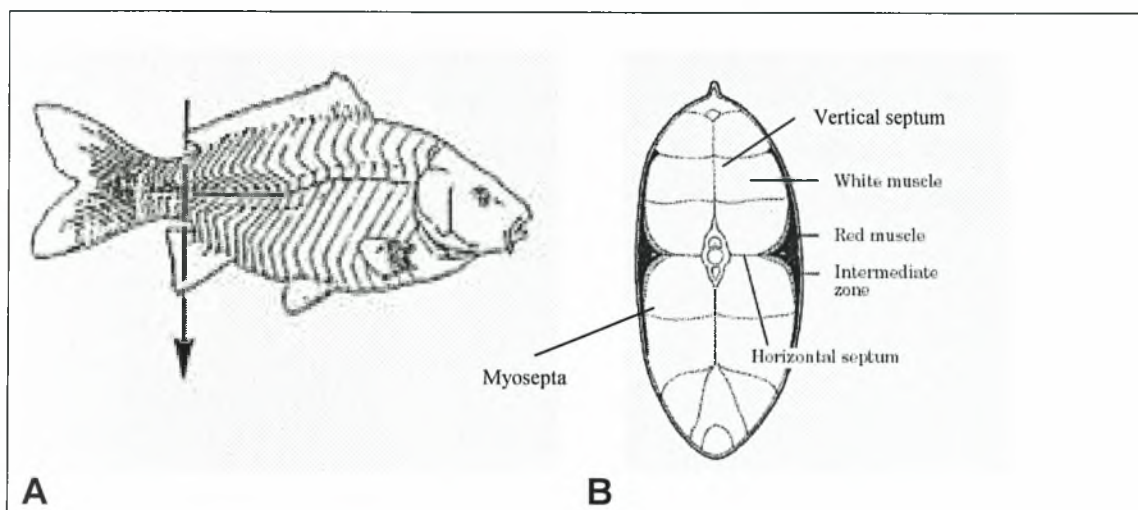
Στο στάδιο της προνύμφης που κολυμπά ελεύθερα τα δύο στρώματα των μυϊκών ινών χωρίζονται από μια ενδιάμεση ζώνη μυϊκών ινών. Οι μυϊκές ίνες αυτής της ζώνης (ενδιάμεσες) σχηματίζονται από τις άσπρες μυϊκές ίνες κάτω από την επίδραση νευρικών επιδράσεων (Van Raamsdonk W., et al., 1978, 1982 a, b, c).

Η "νυμφική" υπερπλαστική διαδικασία ανάλογα με το είδος συμβαίνει λίγο πριν την εκκόλαψη ή αργότερα μετά την εκκόλαψη. Στα είδη που φτάνουν σε ένα μεγάλο μέγεθος, η δεύτερη φάση της υπερπλασίας στις άσπρες μυϊκές ίνες συνεχίζεται μέχρι και την ενηλικίωση.

Η χρονική περίοδος της εμφάνισης της τρίτης υπερπλαστικής διαδικασίας εξαρτάται πάλι από το είδος. Σε ορισμένα ψάρια δεν εμφανίζεται μέχρι την ενήλικη φάση. Σε άλλα αυτήν η διαδικασία ξεκινά στην προνύμφη ενώ σε άλλα δεν εμφανίζεται καθόλου. Στα ενήλικα πλέον ψάρια η ανάπτυξη του μυός γίνεται στην αρχή και με τους δυο μηχανισμούς (υπερπλασία, υπερτροφία). Όταν όμως το ψάρι φτάσει στο 44% του τελικού του μεγέθους, η υπερπλασία σταματά ή καθυστερεί και η περαιτέρω ανάπτυξη του μυός γίνεται μόνο με την υπερτροφία (Koumans J.T.M and Akster H.A., 1995).

## 2.2 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΜΥΪΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Οι μύες διαιρούνται κατά μήκος του σώματος σε τομές, τα μυομερή (ή μυοτόμους) που χωρίζονται μεταξύ τους από τμήματα συνδετικού ιστού (κολλαγόνο) που καλούνται μυοδιαφράγματα (μέσα από αυτά εισέρχονται οι μυϊκές ίνες). Τα μυοδιαφράγματα δημιουργούν μια σειρά αλληλεπικαλυπτόμενων κώνων κατά μήκος του άξονα (παράλληλα στο οριζόντιο διάφραγμα). Αυτό συμβάλλει οι μυοτόμοι να παίρνουν το χαρακτηριστικό σχήμα W όταν παρατηρούνται σε επιμήκεις τομές (Mhut S.N.,1996) (εικόνα 5A). Τα μυομερή χωρίζονται από ένα κάθετο διάφραγμα (vertical septum) σε αριστερούς και δεξιούς μύες και από ένα οριζόντιο διάφραγμα (horizontal septum) σε επάξιους μύες κοιλιακά στο διάφραγμα και σε υπάξιους μύες κάτω από το διάφραγμα.



Εικόνα 5: (A) Ενήλικο τελεόστεο ψάρι. Διακρίνεται το χαρακτηριστικό σχήμα W των μυομερών. (B) Εγκάρσια τομή ενήλικα ψαριού (Stoiber W. et al., 1999).

Μέσα στους μυοτόμους, μόνο οι επιφανειακοί μύες οργανώνονται παράλληλα στον επιμήκη άξονα του σώματος. Οι βαθύτερες μυϊκές ίνες μέσα στους μυοτόμους, οργανώνονται σε ένα είδος ελικοειδών (σπειροειδών) μοτίβων στα οποία οι ίνες διατάσσονται σε διαφορετικές γωνίες. Αυτήν η διάταξη βοηθά οι εσωτερικές μυϊκές ίνες να συστέλλονται με την ίδια ταχύτητα και έτσι να λειτουργούν πιο οικονομικά.

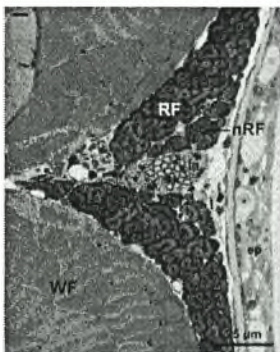
Κατά μήκος των πλευρών, κάτω από το δέρμα βρίσκονται οι πλευρικοί επιφανειακοί μύες (εικόνα 5B). Είναι πλούσιοι σε αιμοφόρα αγγεία και έχουν υψηλή συγκέντρωση λιπών. Καλούνται κόκκινοι μύες λόγω του ότι ο ιστός εμφανίζεται κόκκινος από την υψηλή συγκέντρωση αιμογλοβίνης. Αυτοί οι μύες χρησιμοποιούνται φυσιολογικά για να στηρίξουν το κολύμπι σε χαμηλές ή υψηλές ταχύτητες (είναι μεγαλύτεροι και περισσότεροι στα ενεργά από ότι στα καθιστικά ψάρια).

Η αναλογία των κόκκινων μυών στις εγκάρσιες τομές μειώνεται από τα πρόσθια στα οπίσθια μυομερή. Το υπόλοιπό της μυϊκής μάζας αποτελείται στην μεγαλύτερη πλειοψηφία του από τους «λευκούς» μύες που δεν έχουν καθόλου αιμογλοβίνη (εικόνα 5B). Αυτοί οι μύες χρησιμοποιούνται για έντονο κολύμπι ή για αποφυγή αιχμαλωσίας από τους θηρευτές (Evans, D., 1995) και γενικά σε καταστάσεις όπου η επιβίωση είναι σημαντική.

Υπάρχει και ένα στρώμα μυών που βρίσκονται στο οριζόντιο διάφραγμα ανάμεσα στους κόκκινους και άσπρους μύες (ενδιάμεση ζώνη) και καλούνται ροζ μύες (εικόνα 5B). Οι τελευταίοι είναι γρήγοροι μύες και χρησιμοποιούνται για ταχύτητες κολύμβησης που αφενός είναι πολύ υψηλές για να συντηρηθούν από τους κόκκινους μύες και αφετέρου είναι πολύ χαμηλές για στρατολόγηση των λευκών μυών.

### 2.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΥΪΚΩΝ ΙΝΩΝ

Στα ψάρια το κάθε είδος μυός συνίσταται από δομικά και λειτουργικά διαφορετικούς τύπους ινών που διακρίνονται εύκολα από το χρώμα, το μέγεθος και το σχήμα τους. Αυτοί οι τύποι μυϊκών ινών είναι πολύ σημαντικοί για την κίνηση και ο κάθε τύπος έχει διαφορετικές συσταλτές και βιοχημικές ιδιότητες.



Εικόνα 6: Εγκάρσια τομή προνύμφης. Διακρίνονται οι άσπρες μυϊκές ίνες (WF), οι κόκκινες μυϊκές ίνες (RF). Σ' αυτό το στάδιο δεν έχουν δημιουργηθεί ακόμα οι ροζ μυϊκές ίνες (Stoiber, W., et al., 1999).

Στους κόκκινους μύες (Εικόνα 6) υπάρχουν οι αργές (τονικές) οξειδωτικές μυϊκές ίνες, που μεταβολίζουν αερόβια. Είναι σχετικά μικρής διαμέτρου (100-200  $\mu\text{m}$ ), έχουν καλή αγγειακή αιμάτωση και άφθονη μυογλοβίνη που δίνει και το κόκκινο χρώμα. Έχουν άφθονα μεγάλα μιτοχόνδρια και όλα τα ένζυμα που χρειάζονται για τον αερόβιο οξειδωτικό μεταβολισμό μέσω του οποίου παίρνουν την ενέργεια. Χρησιμοποιούν ως καύσιμα τα λιπίδια (από τον λιπώδη ιστό) και το γλυκογόνο (από το ήπαρ και τους μύες). Έχουν χαμηλή συγκέντρωση ασβεστιοπροσδεσμένων πρωτεϊνών και η ATPάση της μυοσίνης έχει χαμηλή δράση. Παράγουν σημαντικό ποσό ενέργειας, λειτουργώντας αερόβια και γι αυτό μπορούν να συστέλλονται για μακρύς περιόδους. Έτσι λειτουργούν σε αποδόσεις συνεχόμενης δουλειάς.

Στους λευκούς μύες (εικόνα 6) υπάρχουν οι γρήγορα γλυκολυτικές ίνες. Αυτές χρησιμοποιούν τον αναερόβιο μεταβολισμό για την παραγωγή ενέργειας. Είναι διαμέτρου 300-400  $\mu\text{m}$ . Έχουν πολύ λίγα αιμοφόρα αγγεία και καθόλου αιμογλοβίνη. Έχουν λίγα και μικρά μιτοχόνδρια και ένζυμα για την αναερόβια γλυκόλυση. Έχουν υψηλή συγκέντρωση ασβεστιοπροσδεσμένων πρωτεϊνών καθώς και υψηλή δράση ΑΤΡάσης της μυοσίνης (Bone Q., et al.,1995). Χρησιμοποιούν ως καύσιμα για την παραγωγή ενέργειας φωσφοκρεατίνη και γλυκόζη. Αποθηκεύουν και χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας κυρίως γλυκογόνο. Τα αποθέματα φωσφοκρεατίνης και γλυκόζης μειώνονται γρήγορα γι αυτό και τα ψάρια έχουν χαμηλή αντοχή σε υψηλές ταχύτητες κολύμβησης. Οι γρήγορα γλυκολυτικές ίνες της άσπρης μερίδας των μυοτόμων είναι ενεργές μόνο κατά τα ξεσπάσματα όπου απαιτείται μέγιστη ταχύτητα κολύμβησης.

Στους ροζ μύες βρίσκονται οι γρήγορα οξειδωτικές ίνες. Αυτές έχουν μικρότερο ποσό αιμογλοβίνης και ενδιάμεσα χαρακτηριστικά μεταβολισμού και συστολής.

Συνεπώς τα ψάρια έχουν δυο διαφορετικά κινητικά συστήματα στα μυομερή τους που λειτουργούν με διαφορετικά καύσιμα και χρησιμοποιούν διαφορετικές βιοχημικές πορείες για τη παραγωγή ενέργειας (Bone Q., et al.,1995). Αυτά τα δύο συστήματα ενεργοποιούνται σε διαφορετικά είδη κολυμπιού το καθένα.

### 1.3 ΤΣΙΠΟΥΡΑ



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της Τσιπούρας (Bauchot, M.L., and Hureau, J.C., 1990).



### 1.3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η κοινή ονομασία της Τσιπούρας (Εικόνα 7) είναι *Gilthead Sea Bream*. Ανήκει στο είδος *Sparus*, γένος *Aurata*, οικογένεια *Sparidae*, σειρά *Perciformes*, τάξη ακτινοπτερυγιά, κλάση όστεοιχθύς, υπερκλάση γναθοστόματα, υπόφυλο σπονδυλωτά και φύλο χορδωτά. Είναι τριπλοβλαστικό, κοιλωματικό, δευτεροστόμιο ζώο με αμφίπλευρη συμμετρία.

Η Τσιπούρα είναι ένα πρώτανδρο ερμαφρόδιτο ψάρι που μπορεί να φτάσει γύρω στα 70 cm σε μήκος και στα 17,2 Kg σε βάρος. Το συνηθισμένο βάρος του είναι γύρω στα 5 Kg. Μέχρι τους 12-18 μήνες ωριμάζει ως αρσενικό και το βάρος του κυμαίνεται από 500-1500 gr. Λίγο πριν το τέλος του δεύτερου χρόνου της ζωής του, τα περισσότερα από τα άτομα του πληθυσμού γίνονται θηλυκά, και το βάρος τους αυξάνεται (>1500 gr) (Patruno M., et al., 1998). Ο μέγιστος αναφερόμενος χρόνος ζωής είναι 11 χρόνια. Το περιβάλλον του είναι γλυκά, υφάλμυρα και θαλάσσια νερά. Τρέφεται με στρείδια, μύδια και οστρακόδερμα.

Η Τσιπούρα μέχρι να φτάσει στο τελικό της μέγεθος (μήκος 70 cm και βάρος 5 Kg) περνά από αρκετά στάδια ανάπτυξης. Ξεκινώντας από την στιγμή της γονιμοποίησης, ολοκληρώνεται η δημιουργία του βλαστιδίου 5 ώρες αργότερα. Ακολουθεί η γαστρίδιοποίηση και η οργανογένεση. Η οργανογένεση ολοκληρώνεται το πρώτο 24ωρο μετά την γονιμοποίηση.

Στο τέλος του σταδίου της οργανογένεσης υπάρχουν 12 σωμίτες. Στα επόμενα στάδια της εμβρυογένεσης συνεχίζεται η δημιουργία των σωμιτών και στο τέλος της ο αριθμός των σωμιτών φτάνει στους 20. Με την ολοκλήρωση της εμβρυογένεσης (40 ώρες μετά τη γονιμοποίηση) γίνεται η εκκόλαψη. Η εκκολαπτόμενη τσιπούρα καλείται προνύμφη και επιπλέει παθητικά.

### 1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στο συγκεκριμένο πείραμα σκοπός είναι να βρεθεί το πρότυπο έκφρασης της ρυθμιστικής ελαφριάς αλυσίδας 2 της μυοσίνης στα διάφορα στάδια ανάπτυξης της τσιπούρας (προ-μεταμόρφωση, μεταμόρφωση και μετά-μεταμόρφωση). Συγκεκριμένα τα στάδια που μελετούνται είναι οι ηλικίες 4 ημερών, 8 ημερών, 10 ημερών, 15 ημερών, 20 ημερών, 25 ημερών, 34 ημερών, 51 ημερών και 80 ημερών. Παράλληλα παρατηρείται και η οντογένεση του μυός σ' αυτά τα στάδια. Η εύρεση της έκφρασης της MLC2 γίνεται με εφαρμογή της υβριδοποίησης *in situ* σε εγκάρσιες και επιμήκεις τομές της Τσιπούρας.

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι προμηθευτές των χημικών αναλωσίμων καθώς και τα πρωτόκολλα παρασκευής των διαλυμάτων αναγράφονται στο παράρτημα 1.

### 2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ ΚΑΙ ΙΧΘΥΔΙΩΝ

Οι προνύμφες και τα ιχθύδια που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από το εκτροφείο της πειραματικής μονάδας του Πανεπιστημίου *Algarve* της Πορτογαλίας. Τα γονιμοποιημένα αυγά αφού εκκολάφτηκαν (48-56 hr μετά την γονιμοποίηση) καλλιεργήθηκαν σε δεξαμενές όγκου 200l. Οι δεξαμενές αεριζόταν και εφοδιαζόταν συνεχώς με θαλασσινό νερό σε σταθερή θερμοκρασία και αλατότητα 18°C και 36<sup>0/00</sup> αντίστοιχα. Ο φωτισμός ήταν τεχνητός και η επιβαλλόμενη φωτοπερίοδος ήταν 12 hr φως:12 hr σκοτάδι. Στις παραπάνω συνθήκες, η απορρόφηση του λεκιθικού σάκου πραγματοποιήθηκε 4-5 ημέρες μετά την εκκόλαψη και το άνοιγμα του στόματος 5 ημέρες μετά την εκκόλαψη. Με το άνοιγμα του στόματος και την έναρξη λήψης της τροφής η διατροφή τους βασίστηκε αποκλειστικά στο ζωντανό ζωοπλακτόν *Brachionus plicatilis* (5 άτομα / ml νερού). Η τροφή δινόταν μια φορά το πρωί, μια φορά μετά το μεσημέρι και ανανεωνόταν κάθε βράδυ. Από την 9<sup>η</sup> έως την 40<sup>η</sup> ημέρα μετά την εκκόλαψη εισήχθη στην δίαιτα τους το *Artemia sp* και από την 40<sup>η</sup> ημέρα και μετά, η διατροφή τους βασίστηκε μόνο σε ξηρά τροφή.

Για τις ανάγκες του πειράματος συλλέχθηκαν προνύμφες των ηλικιών 4, 8,10,15,20,25 και 34 ημερών μετά την εκκόλαψη, καθώς και ιχθύδια ηλικίας 51 και 80 ημερών μετά την εκκόλαψη.

### 2.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Την ημέρα της συλλογής τα δείγματα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης 4% (PFA). Εκεί παρέμειναν όλη την νύχτα στους 4°C. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκαν πλύσεις. Αρχικά πλύση 3 φορές για 15 min την κάθε φορά σε αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (PBS). Πλύση 1 φορά για 15 min σε αποστειρωμένο νερό. Ακολούθησε μεταφορά σε αποστειρωμένο διάλυμα αιθανόλης 70% και αποθήκευση στους 4 °C μέχρι την χρήση τους.

Στα δείγματα ηλικίας 34, 51 και 80 ημερών πριν την χρήση τους πραγματοποιήθηκε απασβεστοποίηση για να μπορέσει να γίνει εύκαμπτος ο οστίτης ιστός και να είναι δυνατή η τομή τους.



Η απασβεστοποίηση έγινε πραγματοποιώντας αρχικά πλύση των αποθηκευμένων σε αιθανόλη δειγμάτων 3 φορές για 10 min σε απαλαγμένο από RNAάσες νερό (DEPC).

Ακολούθησε μεταφορά των δειγμάτων σε αποστειρωμένο διάλυμα 0,5 M EDTA pH 8,0 και αποθήκευση για το ελάχιστο 7 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι με καθημερινή αλλαγή του διαλύματος EDTA. Ο χρόνος παραμονής των δειγμάτων στις παραπάνω συνθήκες εξαρτήθηκε από την ηλικία τους (τα δείγματα ηλικίας 34 και 51 ημερών παρέμειναν για 1 εβδομάδα ενώ τα ιχθύδια των 80 ημερών για 3 εβδομάδες). Μετά την απασβεστοποίηση πραγματοποιήθηκε πλύση των δειγμάτων 3 φορές με DEPC νερό σε διάστημα 2 hr και αποθήκευση τους σε αποστειρωμένο διάλυμα αιθανόλης 70% στους 4°C.

Τη μονιμοποίηση των δειγμάτων ακολούθησε αφυδάτωση σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης και εγκλεισμός σε παραφίνη. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικές συσκευές που λέγονται κασέτες βιοψίας και η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια επεξεργαστή ιστών. Αναλυτικά, ακολουθήθηκε το πρόγραμμα λειτουργίας της συσκευής του επεξεργαστή ιστών που περιελάμβανε εμβάπτισεις στα παρακάτω διαλύματα: Αιθανόλη 70% για 10 min, αιθανόλη 95% για 30 min, αιθανόλη 100% για 1 hr, αιθανόλη 100% για 1 hr, αιθανόλη : ξυλένιο (1:1) για 1 hr, ξυλένιο για 1 hr, ξυλένιο για 1,5 hr, ξυλένιο : παραφίνη (1:1) για 2 hr, παραφίνη για 2 hr. Ακολουθήθηκε ψύξη των εμβαπτισμένων σε παραφίνη ιστών και δημιουργία πολύ λεπτών τομών (πάχους 5  $\mu$ m) με την βοήθεια του μικροτόμου. Οι δημιουργηθέντες τομές τοποθετήθηκαν σε ειδικά προετοιμασμένες αντικειμενοφόρους πλάκες.

Οι αντικειμενοφόροι πλάκες πριν την χρήση τους επεξεργάστηκαν με APES (αμινοπροπυλτριοεθοξισιλάνη) προκειμένου να καθαριστούν και να γίνουν πιο κολλώδεις. Αυτό βοήθησε στην σταθερότερη προσκόλληση του ιστού στις αντικειμενοφόρους πλάκες.

### 2.3 ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗΣ-ΕΩΣΙΝΗΣ

Για την ιστολογική παρατήρηση των τομών (εκτίμηση της θέσης της τομής και της καταλληλότητας του μυός) πριν την περαιτέρω χρήση τους, χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονη χρώση Αιματοξυλίνης-Εωσίνης (η Αιματοξυλίνη χρωματίζει τους πυρήνες μοβ και η Εωσίνη χρωματίζει το κυτταρόπλασμα ροζ). Αναλυτικά, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. Ενυδάτωση των ιστών πραγματοποιώντας τις πλύσεις: 2 φορές για 15 min με ξυλένιο (απομάκρυνση της παραφίνης), 5 min σε αιθανόλη 100%, 5 min σε αιθανόλη 95%, 5 min σε αιθανόλη 70% και 5 min σε απεσταγμένο νερό.
2. Χρώση σε διάλυμα Αιματοξυλίνης για 30 sec. Πλύση με νερό βρύσης που περιείχε λίγες σταγόνες αμμωνίας 4 M και μετά ξανά πλύση με νερό βρύσης.
3. Χρώση σε διάλυμα Εωσίνης Υ για 30 sec. Πλύση με απεσταγμένο νερό που περιέχει λίγες σταγόνες από ακετικό οξύ και μετά ξανά πλύση με απεσταγμένο νερό.
4. Δεύτερη ενυδάτωση μέσω διαδοχικής βύθισης των δειγμάτων στις βαθμίδες αιθανόλης: 70%, 95% και 100%, 5 min στο κάθε διάλυμα.
5. Βύθιση των δειγμάτων στο K-clear(I) για 5 min και τέλος στο K-clear(II).
6. Μονιμοποίηση των δειγμάτων με DPX και παρατήρηση των ιστών στο μικροσκόπιο.

## 2.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ MLC2

Η μελέτη της έκφρασης έγινε με υβριδοποίηση *in situ*. Η υβριδοποίηση *in situ* επιτρέπει εξειδικευμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες να ανιχνευθούν. Σε συνδυασμό με την ανοσοιστοχημεία, η υβριδοποίηση *in situ* μπορεί να συσχετίσει μικροσκοπική τοπολογική πληροφορία με την ενεργότητα των γονιδίων στο DNA, mRNA και στο επίπεδο πρωτεϊνών. Το ανιχνεύσιμο μόριο συνδέεται άμεσα στον ανιχνευτή που περιέχει το μόριο αναφοράς το οποίο και ανιχνεύεται κυτταροχημικά. Έτσι ο στόχος του ανιχνευτή μπορεί να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο. Το μόριο αναφοράς δεν συμμετέχει στην αντίδραση υβριδοποίησης.

Στο συγκεκριμένο πείραμα το ανιχνεύσιμο μόριο είναι το mRNA της ελαφριάς αλυσίδας 2 της μυοσίνης (MLC2) και το μόριο αναφοράς είναι η διγοξιγενίνη. Η δημιουργία του ρίβο-ανιχνευτή και η σήμανση του με διγοξιγενίνη έγινε με μετασχηματισμό από τα βακτήρια της *E.coli*.

### 2.4.1 Δημιουργία ριβοανιχνευτή

Ο πλασμιδιακός φορέας, η αλληλουχία του ριβοανιχνευτή και οι πηκτές αγαρόζης παρατίθενται στο παράρτημα 2.

Για την δημιουργία του ριβοανιχνευτή χρησιμοποιήθηκε απομονωμένος πλασμιδιακός φορέας pBluescript II sk(+) / 3 kb (Statagene) που περιείχε ένα τμήμα του cDNA της αλληλουχίας της MLC2 μήκους 773 bp. Πηγή του εισαγόμενου τμήματος ήταν η προνύμφη του Ιππόγλωσσου και χρησιμοποιήθηκε η αντινοσηματική ακολουθία του. Αναλυτικά ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα για την παραγωγή του ριβοανιχνευτή:

1.Κυτταρικός μετασχηματισμός: Τα δεκτικά βακτήρια της *E.coli* μεταφέρθηκαν από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  όπου ήταν αποθηκευμένα σε πάγο. Εκεί αφέθηκαν μέχρι να ξεπαγώσουν (για 5 min περίπου) και μετασχηματίστηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pBluescript (II) που περιέχει την αλληλουχία της MLC2. Για τον μετασχηματισμό 1μl από τον απομονωμένο πλασμιδιακό φορέα επωάστηκε σε πάγο μαζί με τα δεκτικά βακτήρια για 30 min και μετά μεταφέρθηκαν στους  $42^{\circ}\text{C}$  για 90 min.

Στην συνέχεια έγινε η επίστρωση τους σε τριβλία με *Luria-Bertani* άγαρ που περιείχε IPTG (0,5 mM), X-γαλακτοσιδάση (80 μg/ml) και αμπικιλίνη (100 μg/ml) και επωάστηκαν όλη τη νύχτα, στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Στη διάρκεια της επώασης λευκές αποικίες αναπτύχθηκαν από τα μετασχηματισμένα βακτήρια.

2.Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από την καλλιέργεια των κυττάρων: Μια μετασχηματισμένη (λευκή) αποικία μεταφέρθηκε κάτω από ασηπτικές συνθήκες, σε αποστειρωμένο σωλήνα που περιείχε περίπου 4ml αποστειρωμένου υγρού μέσου καλλιέργειας LB και επωάστηκε όλη τη νύχτα στους  $37^{\circ}\text{C}$  στα 250 rpm. Την επόμενη ημέρα, η συλλογή των βακτηρίων έγινε σε αποστειρωμένους σωλήνες erpendorf χωρητικότητας 2ml με δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 10,000 rpm για 5 min η καθεμία. Μετά την συλλογή έγινε επαναιώρηση του ιζήματος σε 200 μl διαλύματος GTE, προσθήκη 2 μl RNAase A (10 mg/ml) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Ακολούθως, έγινε προσθήκη 400 μl διαλύματος 0,2M NaOH που περιείχε 1% SDS και επώαση στον πάγο για 5 min, προσθήκη 300 μl οξικού καλίου (AcK) 3M pH 5,2 και επώαση στον πάγο για 45 min.

Το πλασμιδιακό DNA που απελευθερώθηκε με τη λύση των βακτηρίων, συλλέχθηκε στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 10min, μεταφέρθηκε σε καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf που περιείχε 1ml παγωμένης 100% αιθανόλης και παρέμεινε όλη τη νύχτα στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 10,000 rpm για 20 min, απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 500 μl κρύας αιθανόλης 100%. Έγιναν άλλες 2 φυγοκεντρήσεις στις 10,000 rpm για 10 min με μια ενδιάμεση πλύση με 500 μl κρύας αιθανόλης 100%. Με το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min (για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιθανόλης) και επαναιωρήθηκε σε 50 μl αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες. Η ποιότητα του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%.

3.Ευθυγράμμιση του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA: Η ευθυγράμμιση του πλασμιδιακού DNA έγινε με το ένζυμο περιορισμού Pst 1 που έχει μια θέση τομής στην αλληλουχία. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ευθυγράμμισης, προστέθηκαν σε ένα σωληνάκι 1 μl του ένζυμου περιορισμού (Pst 1), 2 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα

του ένζυμου περιορισμού (Buffer H), 8  $\mu$ l απομονωμένου πλασμιδίου και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 20  $\mu$ l. Το μείγμα της αντίδρασης επωάστηκε στους 37°C για 90 min. Πριν τον καθαρισμό, 1 $\mu$ l από το ευθύγραμμο πλασμιδιακό DNA αποθηκεύθηκε στους 4°C για να φορτωθεί στην ίδια πηκτή μαζί με το καθαρισμένο DNA.

4.Καθαρισμός για την ανάκτηση μόνο του φορέα με το DNA: Ο όγκος της προηγούμενης αντίδρασης συμπληρώθηκε στα 100  $\mu$ l με αποστειρωμένο νερό (81  $\mu$ l) και αναμείχθηκε με 100  $\mu$ l φαινόλης (pH 8) και ακολουθήθηκε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 35 min. Μετά από φυγοκέντρηση στις 10,000 rpm για 5 min, συλλέχθηκε το υπερκείμενο (όγκου γύρω στα 85  $\mu$ l) και μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάκι που περιείχε 8,5  $\mu$ l οξικού νατρίου (AcNa) 3M pH 4,5 και 212,5  $\mu$ l παγωμένης αιθανόλης 100%. Το καθαρισμένο DNA συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 10,000 rpm για 20 min και ακολούθησαν δύο πλύσεις με 500  $\mu$ l παγωμένης 100% αιθανόλης και ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις στις 10,000 rpm για 10 min. Με το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min και επαναιωρήθηκε σε 50  $\mu$ l αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες. Η ποιότητα του ευθυγραμμισμένου και του καθαρισμένου DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%.

5. Δημιουργία μη-σημασμένου με διγοξινενίνη RNA: Προκειμένου να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση του ευθυγραμμισμένου DNA που απαιτείται για μεταγραφή *In-vitro* του σημασμένου με διγοξινενίνη ανιχνευτή έγινε μεταγραφή *In-vitro* για δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις DNA (1  $\mu$ l και 3  $\mu$ l). Η αντίδραση μεταγραφής *In-vitro* περιείχε 4  $\mu$ l του 5x ρυθμιστικού διαλύματος μεταγραφής, 1  $\mu$ l DTT (διθειοθειτρώλη) 100m, 5  $\mu$ l από το μείγμα των νουκλεοτιδίων NTP's [1  $\mu$ l από κάθε NTP (10mM) και 1  $\mu$ l αποστειρωμένο νερό], 0,2  $\mu$ l BSA (αλβουμίνη ορού βοδιού) 10 mg/ml, 0,5  $\mu$ l RNA guard, x  $\mu$ l ευθυγραμμισμένου DNA (Χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις), 1  $\mu$ l T7 RNA πολυμεράσης και απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 20  $\mu$ l. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 90 min. Με το τέλος της επώασης προστέθηκαν 2  $\mu$ l 0,2M EDTA (DEPC) και το μείγμα αντίδρασης τοποθετήθηκε στον πάγο για 2 min. Μετά το σταμάτημα της αντίδρασης προστέθηκαν 2,5  $\mu$ l LiCl 4M και 75  $\mu$ l παγωμένης αιθανόλης 100% και το μείγμα με το μετάγραφο παρέμεινε στους -20°C όλη τη νύχτα.

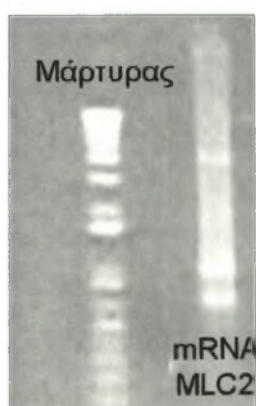
Την επόμενη ημέρα το μη σημασμένο RNA συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 12,000 rpm για 20 min στους 4°C και ακολούθησαν δύο πλύσεις με 500  $\mu$ l παγωμένης αιθανόλης 70% (DEPC) και ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις στις 12,000 rpm για 10 min στους 4°C. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης, το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει για αρκετή ώρα (περίπου 120 min) στον πάγο και επαναιωρήθηκε σε 25  $\mu$ l

αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες. Η ποιότητα του μη-σημασμένου RNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Η καταλληλότερη συγκέντρωση ήταν τα 2 μl.

6. Μεταγραφή *In-vitro* (σήμανση του RNA με διγοξινενίνη): Για την μεταγραφή *In-vitro* του σημασμένου με διγοξινενίνη RNA ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την μεταγραφή *In-vitro* μη-σημασμένου RNA.

Η αντίδραση μεταγραφής *In-vitro* περιείχε 4 μl του 5x ρυθμιστικού διαλύματος μεταγραφής, 1 μl Dig mix, 1 μl DTT (διθειοθειτρώλη) 100m, 5 μl από το μείγμα των νουκλεοτιδίων NTP's [1 μl από κάθε NTP (10mM) και 1 μl αποστειρωμένο νερό], 0,2 μl BSA (αλβουμίνη ορού βοδιού) 10 mg/ml, 0,5 μl RNA guard, 2 μl ευθύγραμμου DNA, 1 μl T7 RNA πολυμεράση και απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 20 μl. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 90 min. Με το τέλος της επώασης προστέθηκαν 2 μl 0,2M EDTA (DEPC) και το μείγμα αντίδρασης τοποθετήθηκε στον πάγο για 2 min. Μετά το σταμάτημα της αντίδρασης προστέθηκαν 2,5 μl LiCl 4M και 75 μl παγωμένης αιθανόλης 100% και το μείγμα με το μετάγραφο παρέμεινε στους -20°C όλη τη νύχτα.

Την επόμενη ημέρα το μη σημασμένο RNA συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 12,000 rpm για 20min στους 4°C και ακολούθησαν δύο πλύσεις με 500 μl παγωμένης αιθανόλης 70% (DEPC) και ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις στις 12,000 rpm για 10 min στους 4°C. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει για 120 min στον πάγο και επαναιωρήθηκε σε 25 μl αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες. Η ποιότητα του σημασμένου RNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 80 Volt για 20 min  
Το mRNA της MLC2 είναι ο σημασμένος ριβοανιχνευτής.



#### **2.4.2 Υβριδοποίηση *in situ***

Για την υβριδοποίηση *in situ* του mRNA της MLC2 με τον ανιχνευτή ακολουθήθηκαν τα παρακάτω στάδια:

1. Πλύσεις: Οι ιστοί ενυδατώθηκαν μέσω πλύσεων: 2 φορές για 5 min με ξυλένιο, 2 φορές για 5 min με αιθανόλη 100%, 5 min με αιθανόλη 95% (DEPC), 5 min με αιθανόλη 75% (DEPC) και τέλος 10 min με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PTW).

2. Προ-υβριδοποίηση: Οι αντικειμενοφόροι πλάκες τοποθετήθηκαν σε ένα κουτί υγρασίας κατάλληλο για επνώσεις (humid box). Η κάθε αντικειμενοφόρος καλύφθηκε με 75 μl από το διάλυμα υβριδισμού στην περιοχή της τομής.

Για διατήρηση της υγρασίας μέσα στο κουτί τοποθετήθηκε στην μια πλευρά του ένα κομμάτι χαρτί διαποτισμένο με 20xSSC διάλυμα που διαποτιζόταν κατά διαστήματα. Τα δείγματα επνώστηκαν στους 56°C για 2 hr.

3. Υβριδοποίηση: Μετά την επώαση οι ιστοί καλύφθηκαν με το διάλυμα του ριβοανιχνευτή (100 μl σε κάθε αντικειμενοφόρο) και μετά με ταινία επικάλυψης για καλύτερη επαφή του ανιχνευτή με τον ιστό. Αφέθηκαν για επώαση στο κουτί υγρασίας στους 56°C όλη τη νύχτα.

4. Απομάκρυνση του μη-ειδικά συνδεδεμένου ανιχνευτή: Την επόμενη ημέρα αφού απομακρύνθηκε η ταινία επικάλυψης με προθερμασμένο διάλυμα 2xSSC στους 56°C, πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω πλύσεις: 2 φορές για 5 min με 2xSSC στους 56°C, 5 min με 1xSSC στους 56°C (όλα τα διαλύματα είναι προθερμασμένα στους 56°C). Ακολούθησε πλύση 2 φορές για 5 min σε διάλυμα 2xSSC/0,12% CHAPS, πλύση 5 min σε διάλυμα 2xSSC/PTW (1/1, v/v), και τέλος πλύση 5 min σε PTW (οι τρεις τελευταίες πλύσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου).

5. Δέσμευση του ανιχνευτή με αντίσωμα: Μετά τις πλύσεις οι αντικειμενοφόροι πλάκες τοποθετήθηκαν στο κουτί υγρασίας και οι ιστοί καλύφθηκαν με 35 μl διαλύματος 2% blocking solution /ορός προβάτου (9/1, v/v) και αφέθηκαν για επώαση 2 hr σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά το τέλος της επώασης οι ιστοί της κάθε αντικειμενοφόρου καλύφθηκαν με 75μl διαλύματος σύστασης 1% blocking solution / αντίσωμα (600:1, v/v) και μετά με ταινία επικάλυψης. Τα δείγματα αφέθηκαν για επώαση όλη την νύχτα στους 4°C.

6. Ανάπτυξη χρώματος: Την επόμενη ημέρα πραγματοποιήθηκαν πλύσεις 2 φορές για 5 min με διάλυμα Tris-NaCl pH 7,5 και 10 min με το ρυθμιστικό διάλυμα ανάπτυξης χρώματος. Ακολούθησε βύθιση σε 25 ml ρυθμιστικό διάλυμα ανάπτυξης χρώματος στο οποίο είχε ήδη προστεθεί 4,5 μl NBT και 3,5 μl BCIP και επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 36-38°C για 60 min. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης (εμφάνιση χρώματος) τα δείγματα βυθίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (1xPBS) για να σταματήσει η αντίδραση και πραγματοποιήθηκε πλύση 2 φορές για 5



min με 1xPBS. Ακολούθησε βύθιση σε διάλυμα 4% παραφορμαλδευδης (PFA) για 15 min, πλύση 2 φορές για 5 min με 1xPBS και τέλος πλύση 2 φορές για 5 min με απεσταγμένο νερό. Όλες οι πλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν με προθερμασμένη γλυκερόλη στους 37°C και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Οι καλύτερες τομές φωτογραφίστηκαν.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο ριβοανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν το cDNA της αλληλουχίας της MLC2 του Ιππόγλωσσου που απομονώθηκε από τα προνυμφικά στάδια του (στο στάδιο των 30 σωματιών). Χρησιμοποιήθηκε η ισομορφή A της ελαφριάς αλυσίδας 2 της μυοσίνης. Η αλληλουχία αυτή ήταν 803 bp και χρησιμοποιήθηκε η αντινοσηματική αλληλουχία (773 bp). Η κωδικοποιούσα περιοχή ήταν το 71% (570/803 bp) της αλληλουχίας και η 3-UTR περιοχή το υπόλοιπο (233 bp). Η αλληλουχία της MLC2 του Ιππόγλωσσου είχε κωδικοποιητική περιοχή όμοια κατά 97,5% με αυτήν της Τσιπούρας (πλαίσιο 1). Η αλληλουχία που κωδικοποιεί την MLC2 της Τσιπούρας είχε μήκος 1452 bp και πολύ μεγάλη 3-UTR περιοχή (882 bp). Στην υβριδοποίηση *in situ* ο ριβοανιχνευτής πρέπει να έχει σχετικά μικρό μήκος για την πιο εύκολη διεύθυνση του στον μυϊκό ιστό. Έτσι χρησιμοποιήθηκε η όμοια με της Τσιπούρας αλληλουχία της MLC2 του Ιππόγλωσσου που λόγω του μικρότερου της μήκους είναι καταλληλότερη για την υβριδοποίηση.

Hippoglossus Sparus 60	-----M A A ATGGCA 6 TGGCTTTGGCTTAGGCTTCTCTTCTTGACCACCAACAACCCAGAACTTGAGGATGGCA
Hippoglossus 66 Sparus 120	P K K A K R R Q Q G V R E G S S N V F S CCAAAGAAGGCCAAGAGGAGGCAGCAGGGGGT <b>GAGAGA</b> AGGATCCTCCAATGTGTTCTCC CCCAAGAAGGCCAAGAGGAGGCAGCAG <b>CAGGGCGAGGGT</b> GGATCCTCCAATGTGTTCTCC
Hippoglossus 126 Sparus 180	M L E Q S Q I Q E Y K E A F T I I D Q N ATGTT <b>AGA</b> ACAGAGCCAGATCCAGGAGTACAAGGAGGCTTTCACAATCATCGACCAGAAC ATGTTT <b>GAG</b> CAGAGCCAGATCCAGGAGTACAAGGAGGCTTTCACAATCATTGACCAGAAC
Hippoglossus 186 Sparus 240	R D G I I S K D D L R D V L A T M G Q L AGAGATGGCATCATCAGCAAGGACGAC <b>CTC</b> AGGGACGTGCTGGCCACCATGGGCCAACTG AGAGATGGCATCATCAGCAAGGACGATCTTAGGGACGTGCTGGCCACCATGGGCCAACTG
Hippoglossus 246 Sparus 300	N V K N E E L E A M V K E A S G P I N F AATGTGAAGAATGAGGAGCTGGAGGCCATGGTGAAGGAGGCCAGCGGCCCATCAACTTC AATGTGAAGAATGAGGAGCTGGAGGCCATGGTGAAGGAGGCCAGCGGCCCATCAACTTC
Hippoglossus 306 Sparus 360	T V F L T M F G E K L K G S D P E D V I ACCGTTTTCTGACCATGTT <b>CGGCGAGA</b> AGCTGAAGGGTCTGATCCCGAGGACGTCATC ACCGTCTTTCTGACCATGTT <b>CGGCGAGA</b> AGCTGAAGGGTCTGATCCCGAGGACGTCATC
Hippoglossus 366 Sparus 420	V S A F K V L D P E A T G S I K K E F L GTGAGCGCTTTCAAGGTCCTGGACCCCGAGGCCACTGGCTCCATCAAGAAGGAATTCCTT GTGAGCGCTTTCAAGGTCCTGGACCCCGAGGCCACTGGCGCCATCAAGAAGGAATTCCTT

	E E L L S T Q C D R F T A E E M T N L W
Hippoglossus 426 Sparus 480	GAGGAGCTCCTGAGCACCCAGTGCACAGGTTACCGCTGAGGAGATGACCAACCTGTGG GAGGAGCTCCTGACCACCCAGTGCACAGGTTACCGCTGAGGAGATGACCAACCTGTGG
	A A F P P D V A G N V D Y K N I C Y V I
Hippoglossus 486 Sparus 540	GCGGCTTTCCCCCTGATGTGGCTGGCAATGTTGACTACAAGAACATCTGCTACGTCATC GCTGCTTTCCCCCTGATGTGGCTGGCAATGTTGACTACAAGAACATCTGCTACGTCATC
	T H G E E K E E
Hippoglossus 546 Sparus 598	ACACACGGAGAAGAGAAGGAGGAATAAATCGTCCCCCTTCTCTCAAGACCTCTACCTCCG ACACACGGAGAAGAGAAGGAGGAATAAATC--CCCCTCTCTTCAAGATCCTTACCTCCG
Hippoglossus 602 Sparus 658	TTCAAGCCCCCTT---CACACCTCAGCATCCACTC-ACTCCCTCTTCTCCAGCACCCAGGC CTCAAATCCCATATACTCGACGCAACATCTACTCTACTCACTCTTCTCCGATGCCGTGGC
Hippoglossus 661 Sparus 717	TTCTCTCGCTCAGCTCGCGCCC-CGGCCCACTCTTTCGGCTTGCCAGCTCACTACGAAAA TCCCTCGGACACTCTCGCGCCCTCGGCCGCTCTGTC-GCTTTGCAGCTCACTACAAAAA
Hippoglossus 719 Sparus 777	GA-CTTGTCTCCT-TTATCGAGATCCTCAGTGAGAGGAATGGAGGCTGTGGGGGTGTTTG GAACCTGTCTCCTGTTCTTGAGATACTCAGTGAGAGGACTGGGGGCTGTGGGGTGTTTG
Hippoglossus 779 Sparus 834	TGTGTGAGTAACAACAGGGGGAACATGGGATTATTTTCAATAAAAAATGATCTTTGTGA TGTGTGATTACCAACAGGTG-AACATGGGATTATTTT-CAATAAAAA-TAATCCTTGTGG
Hippoglossus 803 Sparus 894	CACTGAAAAA----- CACTGAAACTCTCTCTCCATCTCTGTCCCTGCCTCTTGTTCGCCCTGCTTTTCTCCCAT
Hippoglossus Sparus 954	----- CACTCATTCTGTCTTCTGCGTTGACGCCAACAGTGCATGCATCATGCCTATGTACAGCG
Hippoglossus Sparus 1014	----- CGTATGCATATGCAGTCCAGTGTATACAGTGGCCAGTCAGACATATCTCTTGGGTGCTGT
Hippoglossus Sparus 1074	----- GGTGCAAGCACAGCCGCTCACTTCAAACAAGTAAGCGGCCTGACCCGAGTGGTCTGTAG
Hippoglossus Sparus 1134	----- TCTCAACCTGACACAGAGTGTTTTATGGACTCGTCCCTTTGTTTGTATCAGGGAGGATAG
Hippoglossus Sparus 1194	----- CACAGTGAAGAGTGGGAGTACCGTACTATAATAGATTGCCTACTCCTTCTCTTTAATCTG
Hippoglossus Sparus 1254	----- TCTCTCCTTCTCTTAAACACAGGCATGACAGGAAAAGTTGCAGTGAAAATGGGAAAGCAT
Hippoglossus Sparus 1314	----- GATTTGGTTCAAATCTTGAATTGGAGAAAGAGATGGTGAAAGATGGTGAGTGGGAGGGA
Hippoglossus Sparus 1374	----- GAGATGAAATAAACGAAAGTGAAATGTCTTGTGTTTGGTCTCTTTTTTCTCCGACTCACTG
Hippoglossus Sparus 1434	----- CTGTTTCTCTCCTGTTTTTCATGACTGTACCAAATAAAGAAGTACAAATAAAATCCACTAT
Hippoglossus Sparus	----- CTTTCGTAAAAA 1452

Πλαίσιο 1: Η ομοιοπαράθεση των δύο αλληλουχιών (ιππόγλωσσου και τσιπούρας) και η αντιστοίχιση των αμινοξέων στις αντίστοιχες βάσεις της αλληλουχίας του ιππόγλωσσου. Με μαύρο χρώμα είναι οι συντηρημένες (όμοιες βάσεις) ενώ με μπλε χρώμα είναι οι ανόμοιες βάσεις.

Η δέσμευση του αντισώματος (αντί-διγοξιγενίνη, συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση) με το αντιγόνο (διγοξιγενίνη του ριβοανιχνευτή) οδήγησε στην δημιουργία ενός μπλε συμπλόκου με την προσθήκη των υποστρωμάτων (BCIP, NBT) λόγω της δράσης της αλκαλικής φωσφατάσης σ' αυτά. Η παρατήρηση της διακύμανσης του χρώματος και της έντασης του στο μυϊκό ιστό των τομών έδωσε πληροφορίες για το πρότυπο έκφρασης της MLC2 στο κάθε αναπτυξιακό στάδιο της Τσιπούρας που μελετήθηκε (η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του ποσού της έκφρασης).

Η έκφραση της ελαφριάς αλυσίδας 2 της μυοσίνης παρατηρήθηκε σε εγκάρσιες και σε επιμήκεις τομές. Για κάθε αναπτυξιακό στάδιο παρατηρήθηκε η έκφραση της μυοσίνης σε τρεις διαφορετικές προνύμφες ή ιχθύδια. Η σύγκριση μεταξύ τους οδήγησε στην ακριβέστερη εξαγωγή συμπερασμάτων και στην επιβεβαίωσή τους. Στο συγκεκριμένο πείραμα όπως προαναφέρθηκε μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης της MLC2 στα αναπτυξιακά στάδια των 4, 8, 10, 15, 20, 25, 34, 51 και 80 ημερών της Τσιπούρας. Σε όλα τα στάδια παρατηρήθηκε πως η MLC2 εκφράζεται μόνο στις άσπρες μυϊκές ίνες. Αναλυτικότερα σε κάθε στάδιο παρατηρήθηκαν τα παρακάτω:

Τσιπούρα ηλικίας 4 ημερών : Στο στάδιο των 4 ημερών οι μυϊκές ίνες σε μια εγκάρσια τομή οργανώνονται στην εξωτερική πλευρά σε ένα λεπτό στρώμα μικρής διαμέτρου κόκκινων μυϊκών ινών και εσωτερικά σε πολλαπλά στρώματα μεγαλύτερων πολυγωνικών άσπρων μυϊκών ινών μέσα στις οποίες η μυογένεση είναι υπό πρόοδο.

Σ' αυτό το στάδιο η πιο έντονη έκφραση της MLC2 εστιάζεται στην επιφανειακή μονοστοιβάδα των άσπρων μυϊκών ινών και στο εσωτερικό των μεγάλων πολυγωνικών ινών, όπου η ανάπτυξη είναι ακόμη υπό πρόοδο (**εικόνα 8Α**). Οι μυϊκές ίνες που εκφράζουν έντονα την MLC2 είναι περισσότερες στα υπάξια από τους επάξια μυομερή και έχουν κατεύθυνση παράλληλη προς τον επιμήκη άξονα. Αυτό το μοτίβο έκφρασης επαναλαμβάνεται σε όλο το μήκος της προνύμφης.

Τσιπούρα ηλικίας 8 ημερών: Στο στάδιο των 8 ημερών η επιφανειακή μονοστοιβάδα των άσπρων μυϊκών ινών, πιο αναπτυγμένη και οργανωμένη από το προηγούμενο στάδιο, εκφράζει έντονα την MLC2. Στις εσωτερικές άσπρες μυϊκές ίνες η MLC2 εκφράζεται σχεδόν σε όλες τις μυϊκές ίνες, αλλά όχι με την ίδια ένταση. Η έκφραση σ' αυτές σε μια εγκάρσια τομή είναι εντονότερη στις βαθύτερες μυϊκές ίνες, που η μυογένεση τους είναι σε εξέλιξη και ειδικά στις εσωτερικές αξονικές μυϊκές ίνες που περιβάλλουν την νωτοχορδή. Η έκφραση είναι εξίσου έντονη στις επάκριες ραχιαίες και κοιλιακές μυϊκές ίνες (**εικόνα 8Α**). Οι μυϊκές ίνες που εκφράζουν έντονα την MLC2 είναι περισσότερες στους υπάξιους από του επάξιους μύες. Κατά μήκος της προνύμφης, η MLC2 εκφράζεται με το παραπάνω πρότυπο σε όλα τα μυομερή (**εικόνα 9Α**). Η έκφραση της MLC2 σ' αυτό το στάδιο είναι πιο έντονη από το προηγούμενο.

Τσιπούρα ηλικίας 10 ημερών: Σ' αυτό το στάδιο οι μυϊκές ίνες είναι λίγο πιο αναπτυγμένες και οργανωμένες από το προηγούμενο στάδιο. Η MLC2 εκφράζεται σε μια εγκάρσια τομή στις ίδιες μυϊκές ίνες όπως και στο προηγούμενο στάδιο (**εικόνα 8Γ**). Η ένταση της έκφρασης παρουσιάζει διακυμάνσεις και στις επιμήκεις τομές (**εικόνα 9Β**). Η έκφραση είναι πιο ασθενής, όπως φαίνεται από τις επιμήκεις τομές σ' αυτό το στάδιο σε σχέση με το προηγούμενο.

Τσιπούρα ηλικίας 15 ημερών : Στο στάδιο των 15 ημερών η MLC2 εκφράζεται εντόνως στις περισσότερες άσπρες μυϊκές ίνες (**εικόνα 8Δ**). Όμως η έκφραση της είναι εντονότερη στις επάκριες περιοχές (αναπαραγωγικές ζώνες) των ραχιαίων και κοιλιακών μυομερών και στην επιφανειακή μονοστοιβάδα των άσπρων μυϊκών ινών. Από τις επιμήκεις τομές φαίνεται ένα διαφορετικό πρότυπο έκφρασης της MLC2 (**εικόνα 9Γ**). Σε σχέση με το προηγούμενο στάδιο η έκφραση της MLC2 είναι πιο έντονη.

Τσιπούρα ηλικίας 20 ημερών: Στο στάδιο των 20 ημερών η MLC2 εκφράζεται πολύ πιο εντόνως σε σχέση με τα προηγούμενα στάδια. Συγκεκριμένα, η ένταση της έκφρασης της MLC2 στις μυϊκές ίνες των κοιλιακών μυομερών είναι πιο υψηλή σε σχέση με τα υπόλοιπα στάδια. Αναλυτικότερα στις εγκάρσιες τομές, η MLC2 εκφράζεται σε όλη την μυϊκή μάζα των άσπρων μυϊκών ινών. Όμως τα κοιλιακά μυομερή εκφράζουν εντονότερα την MLC2 σε περισσότερες μυϊκές ίνες σε σχέση με τα ραχιαία (**εικόνα 8Ε**). Υψηλή έκφραση παρατηρείται επίσης και στις μυϊκές ίνες που βρίσκονται κοντά στον άξονα καθώς και στα μυϊκά διαφράγματα των αξονικών μυομερών. Αυτός ο τύπος έκφρασης παρατηρείται σε όλο το μήκος της μυϊκής μάζας με κάποιες διακριτές αυξομειώσεις στην ένταση (**εικόνα 9Δ**).

Στο στάδιο των 15 και 20 ημερών η εμφανής αύξηση της μυϊκής μάζας σε όλο τον κορμό προήλθε από τις βαθύτερες μυϊκές ίνες. Οι άσπρες μυϊκές ίνες είναι πιο ομογενείς και συμπαγείς από το στάδιο των 10 ημερών. Στις επάκριες περιοχές των ραχιαίων και κοιλιακών μυομερών καθώς και στην ενδιάμεση ζώνη η μυογένεση βρίσκεται ακόμη υπό πρόοδο.

Τσιπούρα ηλικίας 25 ημερών: Σ' αυτό το στάδιο η ανάπτυξη του μυός είναι ακόμα πιο προχωρημένη. Η ένταση της έκφρασης παρουσιάζει διακυμάνσεις στις εγκάρσιες τομές (**εικόνα 8ΣΤ**). Στις εξωτερικές μυϊκές ίνες η έκφραση είναι πιο έντονη σε σχέση με τις βαθύτερες μυϊκές ίνες κατά μήκος του κάθετου διαφράγματος. Στις μυϊκές ίνες των μυϊκών διαφραγμάτων η έκφραση είναι ιδιαίτερα ασθενής. Η έντονη έκφραση εστιάζεται σε περισσότερες μυϊκές ίνες στα ραχιαία από ότι στα κοιλιακά μυομερή. Το παραπάνω μοτίβο έκφρασης επαναλαμβάνεται σε όλο το μήκος της μυϊκής μάζας της τσιπούρας. Η ένταση της έκφρασης μειώνεται σ' αυτό το στάδιο.

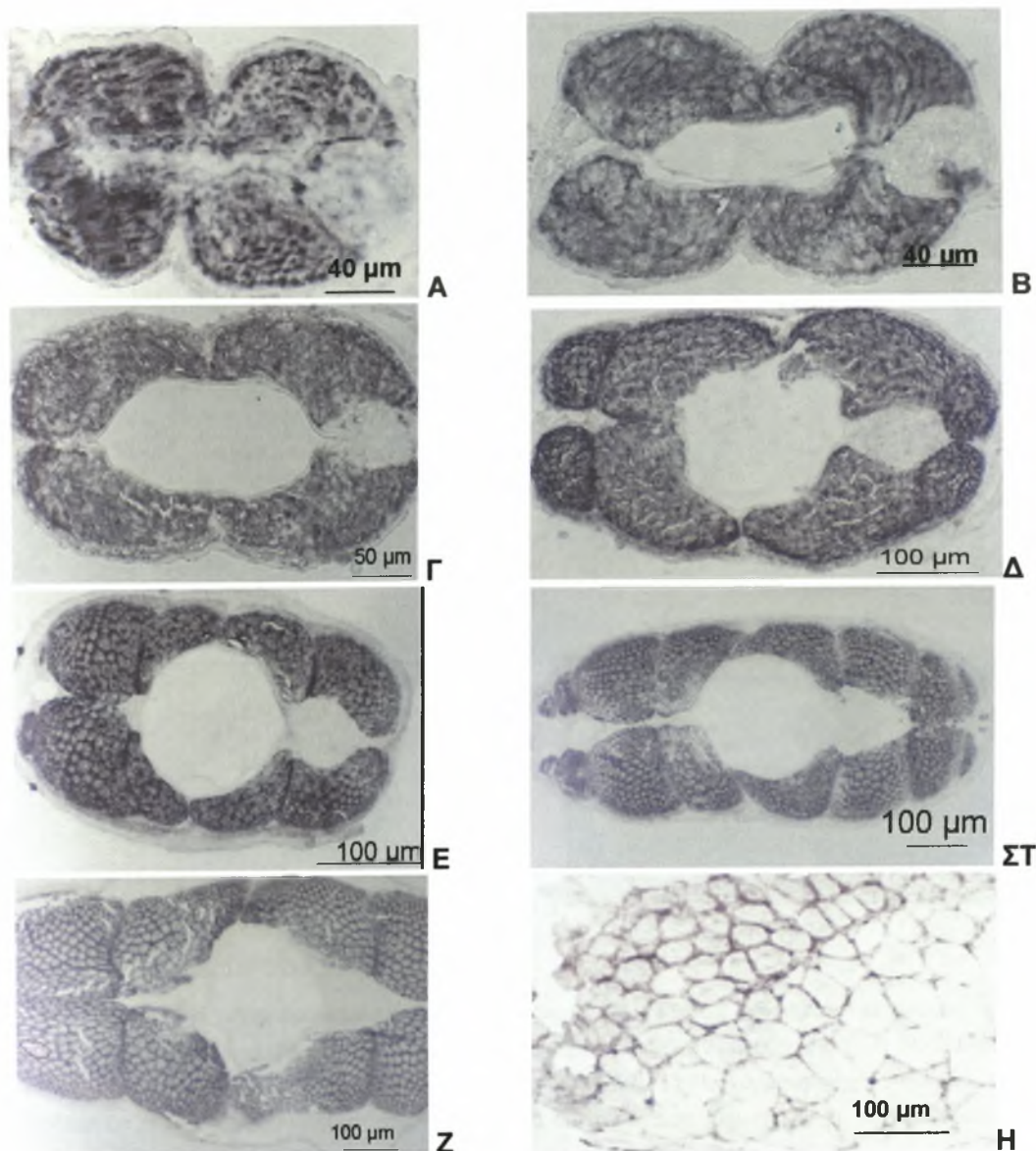
Τσιπούρα ηλικίας 34 ημερών: Η MLC2 εκφράζεται σε ολόκληρο τον μυϊκό όγκο μόνο των άσπρων μυϊκών ινών κατά μήκος του σώματος. Σε μια εγκάρσια τομή (**εικόνα 8Ζ**) η πιο έντονη έκφραση της MLC2 παρατηρείται στα μυϊκά διαφράγματα και στις μυϊκές ίνες στο επίπεδο του οριζόντιου διαφράγματος. Στην υπόλοιπη μυϊκή μάζα (βαθύτερες ώριμες μυϊκές ίνες), η έκφραση είναι εμφανώς πιο ασθενής. Στις επιμήκεις τομές παρατηρείται το ίδιο μοτίβο έκφρασης, αλλά η ένταση της έκφρασης είναι πολύ πιο έντονη και εμφανώς εντονότερη από τα προηγούμενα στάδια (**εικόνα 9Ε**).

Τσιπούρα ηλικίας 51 ημερών: Στην ηλικία των 51 ημερών η μυϊκή μάζα είναι περίπου ίδιου μεγέθους με το στάδιο των 34 ημερών και οργανώνεται πάλι σε 16 μυομερή. Ισχύουν περίπου τα ίδια όπως και στο προηγούμενο στάδιο για την ανάπτυξη του μυός. Σ' αυτό το στάδιο εξασθενίζει περισσότερο η ένταση της έκφρασης της MLC2 (**εικόνα 9ΣΤ**). Η υψηλή ένταση της έκφρασης περιορίζεται μόνο στα μυϊκά διαφράγματα και στις μικρής διαμέτρου μυϊκές ίνες του οριζόντιου διαφράγματος. Στις υπόλοιπες μυϊκές ίνες η έκφραση της MLC2 είναι πάρα πολύ ασθενής έως μηδαμινή.

Τσιπούρα ηλικίας 80 ημερών: Σ' αυτό το στάδιο η Τσιπούρα έχει ήδη χάσει όλα τα τυπικά χαρακτηριστικά της προνύμφης. Σ' αυτό το έφηβο μετά-μορφωτικό στάδιο συμβαίνει μια αξιοσημείωτη μυϊκή ανάπτυξη και οι συνολικοί πλευρικοί μύες είναι καλά αναπτυγμένοι όχι μόνο ως προς τον αριθμό των μυϊκών ινών αλλά και ως προς τους λειτουργικά διαφορετικούς τύπους μυϊκών ινών. Οι μυϊκές ίνες οργανώνονται σε πολυάριθμα μυομερή. Μέσα στο κάθε μυομερές οι μυϊκές ίνες οργανώνονται σε μυϊκές μάζες που περιβάλλονται από συνδετικό ιστό. Οι κόκκινες επιφανειακές μυϊκές ίνες χωρίζονται από τις υποκείμενες άσπρες μυϊκές ίνες με ένα παχύ στρώμα συνδετικού ιστού. Η ανάπτυξη των άσπρων μυϊκών ινών αποδίδεται σε μια νέα υπερπλαστική διαδικασία που εμπεριέχει τις βαθύτερες μυϊκές ίνες.

Σ' αυτό το στάδιο εξασθενίζει ακόμη περισσότερο η έκφραση της MLC2. Συγκεκριμένα η έκφραση της MLC2 περιορίζεται μόνο στις άσπρες μυϊκές ίνες και συγκεκριμένα στις εξωτερικές μυϊκές ίνες που βρίσκονται στον συνδετικό ιστό. Η έντονη έκφραση περιορίζεται μόνο σε ορισμένες αξονικές πλευρικές ίνες (επίπεδο οριζόντιου διαφράγματος). Στις υπόλοιπες άσπρες μυϊκές ίνες εκφράζεται ασθενώς (**εικόνα 8Η**).

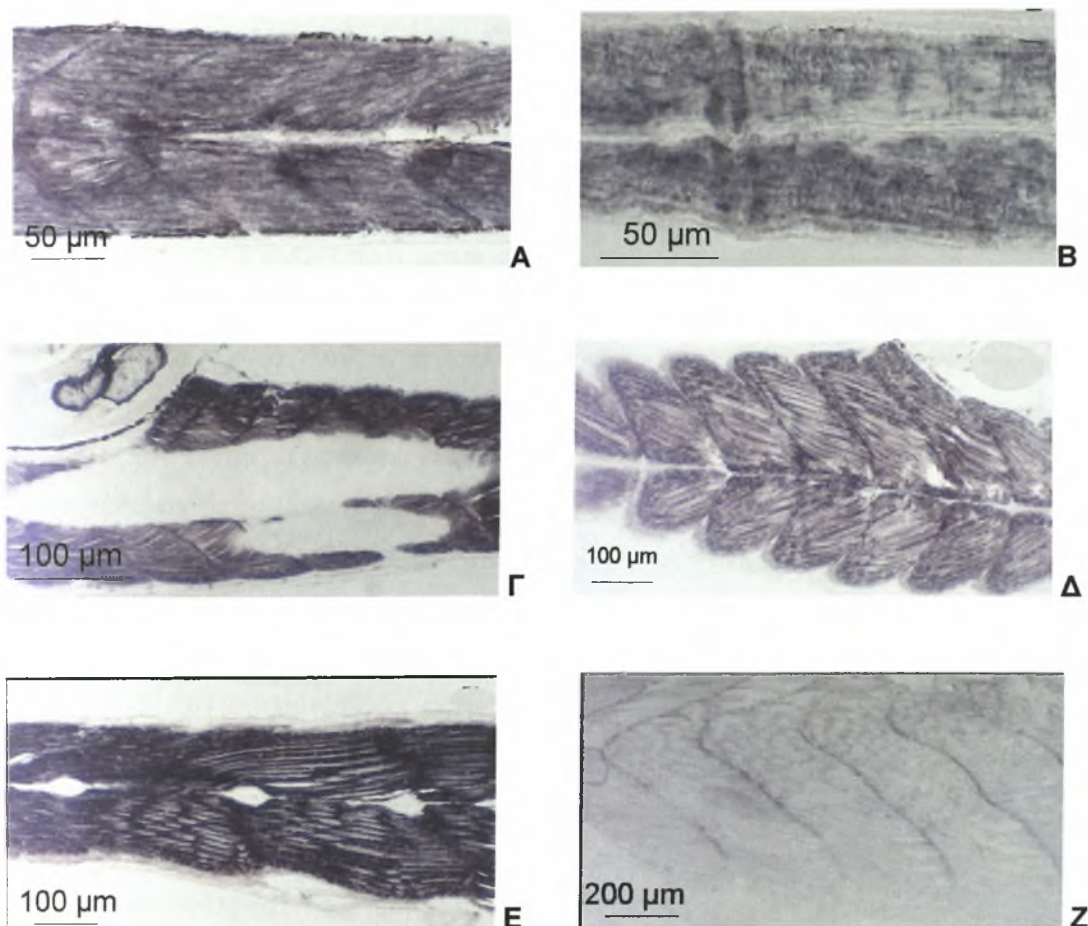




### **ΕΙΚΟΝΑ 8 (Εγκάρσιες τομές)**

**Α)** Προνύμφη ηλικίας 4 ημερών (χ 4). Οι μυϊκές ίνες οργανώνονται σε 4 μυομερή. Διακρίνονται οι μυϊκές ίνες που οργανώνονται σε ένα σχεδόν παράλληλο τύπο (αναπτυσσόμενες μυϊκές ίνες) καθώς και αυτές που τοποθετούνται με μια γωνία κλίσης ως προς τον οριζόντιο άξονα (πιο ώριμες μυϊκές ίνες). Έντονη έκφραση παρατηρείται στην επιφανειακή μονοστοιβάδα των άσπρων μυϊκών ινών και ως επί το πλείστον σε αρκετές παράλληλες άσπρες μυϊκές ίνες (περισσότερες στα υπάγια μυομερή από τα επάγια). **Β)** Προνύμφη ηλικίας 8 ημερών (χ 20). **Γ)** Προνύμφη ηλικίας 10 ημερών (χ 20). **Β), Γ)** Διακρίνονται τα 4 μυομερή. Στο στάδιο των 8 και 10 ημερών η MLC2 εκφράζεται πιο έντονα στις μυϊκές ίνες του επιφανειακού στρώματος και των επάκριων περιοχών καθώς και στις αξονικές μυϊκές ίνες (κοντά στο οριζόντιο διάφραγμα.). **Δ)** Προνύμφη ηλικίας 15 ημερών (χ 20). **Ε)** Προνύμφη ηλικίας 20 ημερών (χ 20). **Δ), Ε)** Οι μυϊκές ίνες οργανώνονται σε 8 μυομερή. Στην προνύμφη ηλικίας 20 ημερών, η MLC2 εκφράζεται εντόνως στις περισσότερες άσπρες μυϊκές ίνες. Παρατηρείται ότι στις επάκριες περιοχές των ραχιαίων, κοιλιακών μυομερών η έκφραση είναι ασθενής. **ΣΤ)** Προνύμφη ηλικίας 25 ημερών (χ 10). Διακρίνονται 16 μυομερή. Η MLC2 εκφράζεται στις περισσότερες μυϊκές ίνες περίπου με τον ίδιο βαθμό έντασης εκτός από την περιοχή των μυϊκών διαφραγμάτων. **Ζ)** 8 από τα 16 μυομερή προνύμφης 34 ημερών (χ 20). Η MLC2 εκφράζεται έντονα στα μυϊκά διαφράγματα ενώ στην υπόλοιπη μυϊκή μάζα ασθενώς. **Η)** Τμήμα της ενδιάμεσης ζώνης από εγκάρσια τομή ιχθυδίου 80 ημερών (χ 20). Διακρίνεται η διαφορά έκφρασης ανάμεσα στις άσπρες μυϊκές ίνες του οριζόντιου διαφράγματος.





**ΕΙΚΟΝΑ 9 (Επιμήκειες τομές)**

**Α)** Οπίσθιο τμήμα προνύμφης ηλικίας 8 ημερών (x 20). Η MLC2 εκφράζεται πιο εντόνως στις άσπρες επιφανειακές και αξονικές μυϊκές ίνες. **Β)** Μεσαίο τμήμα προνύμφης ηλικίας 10 ημερών (x 20). Η MLC2 εκφράζεται πιο ασθενώς από το προηγούμενο στάδιο στις περισσότερες μυϊκές ίνες. **Γ)** Προνύμφη ηλικίας 15 ημερών. Η έκφραση εσπάζεται σε περισσότερες μυϊκές ίνες στα κοιλιακά από ότι στα ραχιαία μυομερή (x 4). **Δ)** Προνύμφη ηλικίας 20 ημερών (x 20). Διακρίνονται 14 μυομερή. Σ' αυτά εντονότερη έκφραση παρατηρείται στις επάκριες περιοχές κάθε μυομερούς και στις αξονικές μυϊκές ίνες. **Ε)** Οπίσθιο τμήμα της ουράς προνύμφης ηλικίας 34 ημερών (x 20). Πολύ έντονη έκφραση σε όλη την μυϊκή μάζα. Στα μυϊκά διαφράγματα όμως η έκφραση είναι πολύ πιο ισχυρή. **Ζ)** Μεσαίο τμήμα ιχθυοειδούς ηλικίας 50 ημερών (x 4). Έντονη έκφραση παρατηρείται μόνο στα μυϊκά διαφράγματα ενώ στις υπόλοιπες μυϊκές ίνες των μυομερών η έκφραση είναι ασθενής έως μηδαμινή.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γενικά τα μυομερή που βρίσκονται στο πρόσθιο τμήμα του σώματος (κοντά στην κεφαλή) εμφανίζονται πολύ πιο αναπτυγμένα και οργανωμένα όσον αφορά την συνολική ανάπτυξη και την εσωτερική δομή των μυϊκών ινών σε σχέση με τα μυομερή της ουράς. Αυτό είναι αποτέλεσμα του γεγονότος ότι η μυογέννεση στα περισσότερα ψάρια εξελίσσεται με κατεύθυνση από την κεφαλή στην ουρά (McGrew M.J. and Pourquie O., 1998). Από τα αποτελέσματα από κάποιες επιμήκεις τομές παρατηρείται ότι η μυοσίνη δεν εκφράζεται στα οπίσθια τμήματα τόσο έντονα όσο στα πρόσθια.

Την 1<sup>η</sup> ημέρα μετά την εκκόλαψη η προνύμφη (μήκους 2,6 mm, 21 σωμίτες) δεν έχει καλά σχηματισμένο κεφάλι και έχει ένα μεγάλο λεκιθικό σάκο στον οποίο βασίζεται για την θρέψη. Ο μυς αποτελείται από τις ήδη δημιουργηθέντες από τους εμβρυονικούς και εμβρυϊκούς μυοβλάστες εμβρυϊκές μυϊκές ίνες. Κάθε μυομερές αποτελείται από ένα παχύ και καλά αναπτυγμένο στρώμα εσωτερικών πολυγωνικών λευκών μυϊκών ινών και μια λεπτή μονοστοιβάδα επιφανειακών κόκκινων μυϊκών ινών. Στις εσωτερικές μυϊκές ίνες η μυογένεση είναι ακόμη υπό πρόοδο (Patruno M., et al., 1998). Μετά την εκκόλαψη η παραπέρα ανάπτυξη των ήδη υπάρχοντων μυϊκών ινών γίνεται με την συγχώνευση των ενήλικων μυοβλαστών (δορυφορικά κύτταρα) μέσω των μηχανισμών της υπερτροφίας και της υπερπλασίας (Koumans J.T.M et al., 1994).

Στα πρώτα στάδια της προνύμφης (0-5 ημέρες μετά την εκκόλαψη) οι εσωτερικές μυϊκές ίνες αναπτύσσονται κυρίως με υπερτροφία. Στο στάδιο των 4 ημερών παρατηρήθηκε πως στα σημεία που συμβαίνει υπερτροφική ανάπτυξη η έκφραση της MLC2 είναι έντονη. Στα επόμενα στάδια (8 ημέρες και μετέπειτα) η αύξηση του μυός όσον αφορά το μήκος και το πλάτος γίνεται κυρίως μέσω της υπερπλαστικής ανάπτυξης που συμβαίνει με απόθεση νέων μυϊκών ινών. Αυτές οι νέες μυϊκές ίνες προέρχονται από τις ραχιαίες και κοιλιακές αναπαραγωγικές ζώνες καθώς και από τα μυογενετικά κύτταρα που βρίσκονται στην πλευρική επιφανειακή μονοστοιβάδα των λευκών μυϊκών ινών και στο οριζόντιο διάφραγμα (Mascarello, F., et al., 1994).

Την 6<sup>η</sup> με 9<sup>η</sup> ημέρα μετά την εκκόλαψη ο λεκιθικός σάκος έχει απορροφηθεί και η προνύμφη (μήκους 3,5-3,7 mm, 23-24 σωμίτες) έχει πιο αναπτυγμένους και οργανωμένους μύες. Υπερπλαστικές διαδικασίες συμβαίνουν στις ακραίες περιοχές των μυομερών (υπάρχουν αρκετά μυοβλαστικά στοιχεία διασκορπισμένα στις αναπαραγωγικές ζώνες). Από τις εγκάρσιες τομές παρατηρήθηκε πως η έντονη έκφραση της MLC2 εστιάζεται σ'αυτές τις περιοχές.

Την 15<sup>η</sup> με 20<sup>η</sup> ημέρα ο λεκιθικός σάκος έχει απορροφηθεί πλήρως και η προνύμφη έχει μήκους 4 mm και 24 σωμίτες. Η συνολική μάζα των μυϊκών κυττάρων είναι πιο αναπτυγμένη, ομογενής και συμπαγής από τα προηγούμενα στάδια. Οι άσπρες μυϊκές ίνες έχουν όλα τα χαρακτηριστικά των διαφοροποιημένων μυϊκών ινών ως προς την μορφολογία και την δομή. Η αύξηση της προνύμφης ως προς το μήκος και το πλάτος, γίνεται κυρίως με την υπερπλαστική ανάπτυξη των βαθύτερων μυϊκών ινών που φτάνουν το μέγιστό τους στο μέσο της διάρκειας της ζωής της προνύμφης. Επίσης η πλευρική γραμμή εμπεριέχεται στην ίδια αναπτυξιακή διαδικασία που σ' αυτό το επίπεδο δίνει γένεση στις τυπικά αργές κόκκινες και αργότερα στις ενδιάμεσες ροζ μυϊκές ίνες. Στις ηλικίες 15, 20 και 25 ημερών παρατηρήθηκε πως η έντονη έκφραση της MLC2 μετατοπίζεται προοδευτικά, καθώς αυξάνεται η ηλικία, από τις επάκριες περιοχές προς τα βαθύτερα στρώματα των μυϊκών ινών όπου και καταλαμβάνει αρκετή μυϊκή μάζα. Η έντονη έκφραση εστιάζεται επίσης και στην πλευρική επιφανειακή μονοστοιβάδα των λευκών μυϊκών ινών.

Στο στάδιο της προ-μεταμόρφωσης (30-40 ημέρες μετά την εκκόλαψη) η προνύμφη έχει καλά αναπτυγμένα όλα τα όργανα και όλους τους ιστούς. Οι πλευρικοί μύες αποτελούνται από το επιφανειακό στρώμα των κόκκινων μυϊκών ινών και από ένα βαθύτερο στρώμα λευκών μυϊκών ινών. Η υπερπλαστική ανάπτυξη των κόκκινων μυϊκών ινών στο οριζόντιο διάφραγμα δίνει γένεση σε ένα αυξανόμενο αριθμό μυϊκών ινών που προοδευτικά επεκτείνονται κάτω και πάνω από τον άξονα. Σ' αυτήν την ηλικία η υπερπλαστική ανάπτυξη στις επάκριες περιοχές (υπάξονες και επάξονες) δίνει γένεση σε ευρείες περιοχές πολύ μικρής διαμέτρου μυϊκών ινών. Η διάταξη των μυομερών σε σχήμα W έχει ολοκληρωθεί (Patruno M., et al., 1998). Στην ηλικία των 34 και 51 ημερών παρατηρήθηκε πως η έκφραση της MLC2 προοδευτικά εξασθενίζει κατά την μεταμόρφωση και στην ηλικία των 51 ημερών που έχει ήδη ολοκληρωθεί η μεταμόρφωση η MLC2 εκφράζεται ασθενώς στις περισσότερες μυϊκές ίνες.

Μετά την 60<sup>η</sup> ημέρα χάνονται τα τυπικά χαρακτηριστικά της προνύμφης και εμφανίζονται τα πρώτα χαρακτηριστικά της ενηλικίωσης (μεταμόρφωση). Το ψάρι σε αυτό το στάδιο καλείται έφηβο. Η σωματογέννεση έχει ολοκληρωθεί και η Τσιπούρα έχει μήκος 14-20 mm και 25 σωμίτες. Οι κόκκινες επιφανειακές μυϊκές ίνες χωρίζονται από τις εσωτερικές λευκές μυϊκές ίνες με ένα παχύ στρώμα συνδετικού ιστού. Το επιφανειακό στρώμα των μυών είναι καλά καθορισμένο και αποτελείται από μικρότερες ίνες. Οι πλευρικοί μύες οργανώνονται σε μια πολύπλοκη σειρά μυομερών. Κάθε μυομερές υποδιαιρείται σε στοιβάδες μυϊκών ινών που περιστοιχίζονται από άφθονο συνδετικό ιστό και μέσα σε κάθε στοιβάδα κάθε μυϊκή ίνα περιβάλλεται από το δικό της στρώμα συνδετικού ιστού. Η ανάπτυξη των λευκών μυϊκών ινών αποδίδεται κυρίως σε μια νέα υπερπλαστική διαδικασία στην οποία συμμετέχουν οι βαθύτερες μυϊκές ίνες. Η

διασπορά των πολύ μικρής διαμέτρου μυϊκών ινών δείχνει ότι ο πολλαπλασιασμός των μυογενετικών κυττάρων λαμβάνει χώρα σε όλη την λευκή μυϊκή μάζα. Σ' αυτήν την υπερπλαστική διαδικασία αποδίδεται η τυπική μωσαϊκή δομή των λευκών μυών.

Στην ηλικία των 80 ημερών παρατηρήθηκε πως η MLC2 εκφράζεται σχετικά ασθενώς γύρω από τις στοιβάδες των μυϊκών ινών. Η έκφραση εντείνεται σε ένα μέρος των λευκών μυϊκών ινών στο επίπεδο του οριζόντιου διαφράγματος.

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι η μυοσίνη εκφράζεται πιο έντονα στις περιοχές που ο μυς βρίσκεται υπό ανάπτυξη. Πράγματι στα προ-μεταμορφωτικά στάδια η MLC2 εκφράζεται στα σημεία που υπάρχουν διασκορπισμένα μυοβλαστικά στοιχεία (αναπαραγωγικές ζώνες επάκριων περιοχών, ενδιάμεση ζώνης και επιφανειακής στοιβάδας άσπρων μυϊκών ινών). Στα μεταμορφωτικά στάδια (34 και 51 ημερών) η MLC2 εκφράζεται κυρίως στα μυϊκά διαφράγματα που ως γνωστόν (Stoiber W. and Sanger A.M., 1996) είναι τα σημεία από όπου εισέρχονται οι αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες, ενώ στις ήδη δημιουργηθέντες μυϊκές ίνες (στην υπόλοιπη μυϊκή μάζα) εκφράζεται ασθενώς. Στο μετά-μεταμορφωτικό στάδιο (ενηλικίωση, 80 ημερών) η MLC2 εκφράζεται μόνο στις αξονικές μυϊκές ίνες που βρίσκονται στο επίπεδο του οριζόντιου διαφράγματος (Van Raamsdonk W., et al., 1978).

Η έκφραση της μυοσίνης εστιάζεται κυρίως στην περιφέρεια των μυϊκών ινών, εκεί που αποτίθενται οι νεοσυντιθέμενες μυϊκές ίνες. Στο εσωτερικό των μυϊκών κυττάρων που βρίσκονται οι δημιουργηθέντες από πριν μυϊκές ίνες δεν παρατηρείται έκφραση. Μόνο στο στάδιο των 4 ημερών που συμβαίνει κυρίως υπερτροφική ανάπτυξη, η MLC2 εκφράζεται και στο εσωτερικό των μυϊκών ινιδίων που η μυογέννηση των μυϊκών ινών είναι υπό πρόοδο. Επίσης σε όλα τα στάδια παρατηρείται ότι οι ανώριμες μυϊκές ίνες (μικρότερης διαμέτρου) εκφράζουν εντονότερα την MLC2 σε σχέση με τις ώριμες.

Τέλος το πρότυπο έκφρασης ακολουθεί μια πορεία όπου η ένταση της έκφρασης αυξάνεται μέχρι το στάδιο της προ-μεταμόρφωσης και ακολούθως μειώνεται στα επόμενα στάδια. Συγκεκριμένα η έκφραση ξεκινά από ένα επίπεδο σχετικά ασθενές στο στάδιο των 4 ημερών, προοδευτικά δυναμώνει μέχρι και το στάδιο των 34 ημερών (με κάποιες διακυμάνσεις) και εν συνέχεια εξασθενίζει. Έτσι στο στάδιο των 80 ημερών (μετά την μεταμόρφωση) η έκφραση της MLC2 είναι πιο ασθενής από το στάδιο των 4 ημερών και περιορίζεται μόνο στο επίπεδο του οριζόντιου διαφράγματος. Παρατηρήθηκε επίσης πως η αύξηση της έντασης της έκφρασης συμβαδίζει με την αύξηση των σωματιών κατά την σωματογένεση. Η έναρξη της εξασθένησης (μεταμορφωτικό στάδιο) συμπίπτει με την ολοκλήρωση της σωματογένεσης (Mascarello, F., et al., 1994).



Συνεπώς, εφόσον η έκφραση της MLC2 είναι σε έντονα επίπεδα, όσο η δημιουργία των σωμιτών και η μυογένεση είναι σε εξέλιξη και εξασθενίζει αισθητά με την ολοκλήρωση τους, υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο μετάγραφο είναι μια εμβρυϊκή ισόμορφη.

Παρατηρήθηκε επίσης πως αν και η ένταση της έκφρασης αρχίζει να μειώνεται μόλις αρχίζει η μεταμόρφωση, η ανάπτυξη του μυός από την προνύμφη στο έφηβο δεν σταματά, αλλά συνεχίζεται με τους ίδιους ρυθμούς καθώς αυξάνεται η ηλικία. Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η MLC2 εκφράζεται ασθενώς στις ήδη δημιουργηθέντες μυϊκές ίνες και ότι εκφράζεται κυρίως στις νεοδημιουργηθέντες, προφανώς υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη ισόμορφη αντικαθίσταται προοδευτικά από κάποια άλλη ενήλικη ισόμορφη.

Το συγκεκριμένο μετάγραφο επίσης δεν είναι το ίδιο για όλα τα είδη μυϊκών ινών. Όπως παρατηρήθηκε το συγκεκριμένο μετάγραφο εκφράζεται μόνο στις άσπρες μυϊκές ίνες. Στις αργές κόκκινες μυϊκές ίνες και στις ενδιάμεσες ροζ μυϊκές ίνες εκφράζεται άλλο μετάγραφο. Αυτό πιθανόν να σχετίζεται και με την λειτουργία του κάθε είδους των μυϊκών ινών και τον πληθυσμό των μυοβλαστών από τον οποίο προέρχεται. Συνεπώς, η έκφραση της MLC2 εξαρτάται επιπλέον και από τον πληθυσμό των μυοβλαστών από τον οποίο προέρχεται (Devoto M., et al., 1996, Van Raamsdonk W., et al., 1978, 1982 a, b, c).



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D., (1994). Molecular Biology of the cell, 3<sup>rd</sup> edition. Garland Publishing, Inc. New York, USA, p: 639-645.

Blagden, C.S., Currie, P.D., Ingham, P.W. and Hufhes, S.M., (1997). Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Genes and Development*, 11: 2163-2175.

Brent, A.E., and Tabin, J.C., (2002). Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12:548-557.

Bone, Q., Marshall, N.B. and Blaxter, J.H.S., (1995). Biology of fishes, 2<sup>nd</sup> edition. Chapman, H., p:45-63.

Campion, D.R., (1984). The muscle satellite cell: a review. *International Review of Cytology*, 87: 225-251.

Cossu, G., Tajbakhsh, S. and Buckingham, M., (1996). How is myogenesis initiated in the embryo. Elsevier Science Ltd, 12: 218-223.

Devoto, S.H., Melancon, Eisen, J.S. and Westerfield, M., (1996). Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development*, 122: 3371-3380.

Donoghue, J.M. and Sanes, R.J., (1994). All muscles are not created equal. *Science*, 10: 396-401.

Evans, D., (1995). The physiology of fishes. Marine Science Series, p: 51-57.

Firulli, B.A. and Olson, N.E., (1997). Modular regulation of muscle gene transcription: a mechanism for muscle cell diversity. Elsevier Science Ltd, 13: 364-369.

Gauthier, G.F., Lowey, S., Benfield, P.A. and Hobbs, A.W., (1982). Distribution and properties of myosin isoenzymes in developing avian and mammalian skeletal muscle fibres. *Journal of Cell Biology*, 92: 472-484.

Goldspink, G., (1972). Postembryonic growth and differentiation of striated muscle. In the Structure and function of muscle. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, New York, p:179.

Hill, J. A., Kiessling, A. and Devlin, R. H., (2000). Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) transgenic for a growth hormone gene construct exhibit increased rates of muscle hyperplasia and detectable levels of differential gene expression. *Canadian Journal of Fishes and Aquatic Science*, 57: 939-950.

Hirayama, Y., Kobiyama, A., Ochiai, Y., and Watabe, S., (1998). Two types of mRNA encoding myosin regulatory light chain in carp fast skeletal muscle differ in their 3' non-coding regions and expression patterns following temperature acclimation. *The Journal of Experimental Biology*, 201:2815-2820.

Holland, Z.L., Pace, A.D., Blink, L.M., Kene, M. and Holland, N.D., (1995). Sequence and Expression of Amphioxus Alkali Myosin Light Chain (AmphiMLC-alk) Throughout

Development: Implications for Vertebrate Myogenesis. *Developmental Biology*, 171: 665-676.

Izumo, S., Nadal-Ginard, B. and Mahdani, V., (1986). All members of MHCs multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science*, 231: 597-600.

Johnston, I.A., Vieira, V.L.A. and Abercromby, M., (1995). Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring *Clupea harengus*. *Journal of Experimental Biology*, 198: 1389-1403.

Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Witkam, A. and Osse, J.W.M., (1994). Numbers of muscle nuclei and myosatellite cell nuclei in red and white axial muscle during growth of the carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Fish Biology*, 44: 391-408.

Koumans, J.T.M and Akster, H.A., (1995). Myogenic cells in development and growth of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 110A: 3-20.

Malcolm, J., (1995). *Environmental Biology of fishes*, 1<sup>st</sup> edition, p:265-269.

Mascarello, F., Rowlerson, A., and Veggetti A. (1994). Hyperplasia of lateral muscle during normal growth of the sea-bream, *Sparus aurata*. *Journal of Muscle Research in Cell Motility*, 15:189.

McGrew, M.J. and Pourquie, O., (1998). *Current Opinion in Genetics and Development*, 8:487-493.

Meyer-Rochow, V.B and Ingram, J.R., (1993). Red-White muscle distribution and fibre growth dynamics: a comparison between lacustrine and riverine populations of the southern smelt *Retropinna richardsoni*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B.*, 252: 85-92.

Molkentin, J.D. and Olson, E.N., (1996). Defining the regulatory networks for muscle development. *Current Opinions in Genetic Development*, 6: 445-453.

Moutou, K., Canario, A., Mamuris, Z. and Power, D., (2001). Molecular cloning and sequence of *Sparus aurata* skeletal myosin light chains expressed in white muscle: developmental expression and thyroid regulation. *The Journal of Experimental Biology*, 204: 3009-3018.

Moyle, J., and Cech, Jr., (1995). *Fishes: An introduction to Ichthyology*. 3<sup>rd</sup> edition, p:24-26.

Mnút, S.N., (1996). *Animal Physiology: adaptation and environment*. 5<sup>th</sup> edition, p:54-58.

Olson, E.N., (1992). Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Development Biology*, 154: 261-272.

Patrino, M., Radaelli, F., Mascarello, M.D. and Carnevali, C., (1998). Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile. *Anatomic Embryology*, 198: 487-504.

Periasamy, M., Strehler, E., Garfinkel, L., Gubits, R., Ruiz-Opazo, N. and Nabal-Ginard, B., (1984). Fast skeletal muscle myosin light 1 and 3 are produced from a single gene by a combined process of differential RNA transcription and splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 13595-13604.

Rowlerson, A., Radaelli, G., Mascarello, F. and Veggetti, A., (1997). Regeneration of skeletal muscle in two teleost fish: *Sparus aurata* and *Brachydanio rerio*. *Cell Tissue Research*, 289: 311-322.

Rowlerson, A., Radaelli, G., Mascarello, F. and Veggetti, A., (1995). Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L).II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. *Journal of Muscle Research in Cell Motility*, 16: 223-236.

Schiaffino, S. and Reggiani C., (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 77(2): 493-501.

Stoiber, W., Haslett, J.R and Sanger, A.M., (1999). Myogenic patterns in teleosts: what does the evidence really suggest? *Journal of Fish Biology*, 55:84-99.

Stoiber, W. and Sanger, A.M., (1996). An electronmicroscopic investigation into the possible source of new muscle fibres in teleost fish. *Anatomic Embryology*, 194:569-579.

Thiebaud, P., Rescan, P.Y., Barillot, W., Ralliere, C. and Theze, N., (2001). Developmental program expression of myosin alkali light chain and skeletal actin genes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, 1519: 139-142.

Watabe, S., (1999). Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *Journal of Fish Biology*, 55:1-18.

Weatherley, A.H. and Gill, H.S., (1985). Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth. *Experientia*, 41:353-354.

Weatherley, A.H., (1990). Approaches to understanding fish growth. *Transactions of the American Fishes in Society*, 119: 662-672.

Weeds, A.G., and Lowey, S., (1971). Substructure of the myosin molecule II. The high chains of myosin. *Journal of Molecular Biology*, 61: 701-725.

Whalen, R.G., Sell, S.M., Butler-Browne, G.S., Schwartz, K., Bouveret, P. and Pinset-Harstrom, I., (1981). Three myosin heavy chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature*, 292: 805-809.

Van Raamsdonk, W., Pool, C.W. and Te Kronnie, G., (1978). Differentiation of muscle fibre types in the teleost *Brachydanio rerio*. *Anatomical Embryology*, 153: 137-155.

Guyton, A.G., (1992). Ιατρική Φυσιολογία. Επιστημονικές Εκδόσεις «Γρηγόριος Παρισιανός». 8<sup>η</sup> έκδοση, 6:87,8:113.

Stryer Lubert, (1997). Βιοχημεία II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 2<sup>η</sup> έκδοση. Σελ: 1016-1019.

Σμοκοβίτη, Α., (1999). Φυσιολογία. Εκδοτικός Οίκος Αδερφών Κυριακίδη. Σελ:120-122.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ-ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

#### Α).ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΡΙΒΟΑΝΙΧΝΕΥΤΗ

##### GTE (απορρυπαντικό)

Για 100ml:

1,125 g Γλυκόζη

2,5 ml Tris 1M pH 8

2 ml EDTA 0,5M pH 8.

Συμπλήρωση του όγκου με δις-αποστειρωμένο νερό και αποστείρωση στο αυτόκαυστο.

##### Οξικό κάλιο

Για 100 ml

60 ml οξικού καλίου 5M

11,5 ml Glacial οξικό οξύ. Το pH πρέπει να είναι ανάμεσα στο 4,8 και στο 5,2.

##### Οξικό νάτριο 3M pH 5.2

Για 100 ml:

24,6g οξικού νατρίου

##### Ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,5)

MgCl 10mM

NaCl 50 mM

Tris-HCl 90mM

##### Διάλυμα 0,2M NaOH /1% SDS

Για 1 ml

100  $\mu$ l 10x SDS

40  $\mu$ l NaOH 5M

Συμπλήρωση του όγκου με δις-αποστειρωμένο νερό.

##### Dig Mix

10 mM ATP

10 mM GTP

10 mM CTP

6,5 mM UTP

3,5 mM Dig-11-UTP pH 7,5

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής για την T7 RNA πολυμεράση.

0,4 M Tris-HCL pH 8,0  
60 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM DTT (διθειοθειτρώλη)  
20 mM σπερμιδίνη  
100 mM NaCl

RNA guard TM (αναστολέας RNAase A)

5\*1000 units  
38,660 u/ml  
Αποθήκευση στους 20°C

RNAase A

Πυριμιδινό-ειδική ενδοριβονουκλεάση που δρα σε μονόκλωνο RNA

Πηγή: πάγκρεας του βοδιού

Πηκτή Αγαρόζης 1%

Για 25 ml:  
25 ml TBE (1x) [ με αρραίωση από TBE (10x)]  
0,25 g αγαρόζης  
25 μl βρωμιούχο αιθίδιο.

TBE (10x)

Για 1l  
108 g Tris-βάση  
55 g Βορικό οξύ  
40 ml EDTA (0,5 M) pH 8.  
Διάλυση σε 1l νερό και αποστείρωση στο αυτόκαυστο.  
Για RNA χρησιμοποιείται DEPC νερό ενώ για το DNA χρησιμοποιείται αποστειρωμένο νερό.

Νερό DEPC

Για 1l  
Προσθήκη 100 μl DEPC (διεθυλπυροάνθρακικό) σε 1l δις-απεσταγμένο νερό και αποστείρωση στο αυτόκαυστο.

Διάλυμα φόρτωσης

Για 100 ml  
0,25 g μπλε της βρωμοφαινόλης  
40 gr σουκρόζη σε νερό  
Συμπλήρωση του όγκου με αποστειρωμένο νερό που διατηρείται στους 4 °C.



## B). ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ IN SITU

### Επεξεργασία αντικειμενοφόρων πλακών με APES

1. Εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων πλακών σε 1% οξύ / αλκοόλη [1% (v/v) HCl, 70% Αιθανόλη, 29% H<sub>2</sub>O] για 30 min για να καθαριστούν.
2. Πλύση σε τρεχούμενο νερό βρύσης πρώτα και μετά πλύση με απεσταγμένο νερό.
3. Ξήρανση και εμβάπτιση σε ακετόνη για 10 min.
4. Εμβάπτιση σε [2% (v/v) APES σε ακετόνη] για 5 min μέσα σε γυάλινη συσκευή
5. Πλύση 2 φορές σε απεσταγμένο νερό, στέγνωμα και αποθήκευση.

### Ρυθμιστικό διάλυμα Φωσφορικών 1M pH 7.4 (PBS)

Για 250 ml:

31,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

11,70 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

Διάλυση σε milliQ H<sub>2</sub>O (απεσταγμένο νερό που έχει διαπεραστεί από φίλτρο) .

Ρύθμιση pH στο 7,4 και συμπλήρωση του όγκου στα 250 ml).

### 10xPBS stock solution

75.97 g NaCl

12.46 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

4.80 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

Διάλυση σε 800 ml MilliQ νερού.

Ρύθμιση του pH στο 7.

Συμπλήρωση του όγκου στο 1l.

Αποστείρωση στο αυτόκαυστο.

### 1xPBS

Διάλυση του 10xPBS με 2 φορές απεσταγμένο νερό

### PTW (1x)

Διάλυση του 10xPBS stock solution σε DEPC νερό και προσθήκη 0,1% Tween 20.

### EDTA 0. 5M pH 8.0

Για 1000 ml.

186,12 gr EDTA·Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O

Προσθήκη 600 ml απεσταγμένου νερού και ρύθμιση του pH στο 8,0 με NaOH.

Προσαρμογή τον τελικό όγκο στο 1l.

### Εωσίνη Υ

Για 100 ml προσθήκη:

1g Εωσίνη Υ

100 ml απεσταγμένου νερού.

### Αιματοξυλίνη

Για 500 ml:

2,5 g Harry's Hematoxilin

50 g Potassium Aluminium Sulphate.12 H<sub>2</sub>O

1,25 g κόκκινο HgO

20 ml οξικό οξύ glacial

25 ml αιθανόλη

Διάλυση της αιματοξυλίνης σε 25 ml αιθανόλης.

Διάλυση του θεικού αλουμίνιο σε 500 ml προθερμασμένου νερού.

Ανάδευση των διαλυμάτων και θέρμανση τους μέχρι βρασμού για 4 min.

Προσθήκη HgO. Βράσιμο για 1 min μέχρι να χρωματισθεί σκοτεινό ροζ.

Γρήγορη ψύξη σε τρεχούμενο νερό και προσθήκη 20 ml glacial οξικού οξέος

Φιλτράρισμα. Λίγο πριν την χρήση τους διάλυση 50:50 (v/v) σε αιθανόλη και

φιλτράρισμα (αποφυγή εξάτμισης της αιθανόλης γιατί τείνει να καθιζάνει η

Αιματοξυλίνη)

### 20xSSC stock solution

175,3 g NaCl

88,2 g κιτρικό νάτριο

Διάλυση σε 800 ml με MilliQ νερό.

Ρύθμιση του pH στο 7.

Συμπλήρωση του όγκου στο 1l.

Αποστείρωση στο αυτόκαυστο

Διάλυμα υβριδισμού (περιέχει όλα τα συστατικά του μείγματος υβριδοποίησης εκτός του ανιχνευτή)

20 ml φορμαμίδη

8 ml 20xSSC

4 ml dextran sulphate

800 ml 50x Denhardt's

800 ml tRNA μαγιάς (50 mg/ml)

800 ml 2% CHAPS

400 ml Ηπαρίνη (10 mg/ml)

Ρύθμιση του pH στο 6 με κιτρικό οξύ και συμπλήρωση του όγκου στα 40 ml με DEPC νερό.

#### Διάλυμα του ριβοανιχνευτή

Περιέχει το ριβοανιχνευτή και το διάλυμα υβριδισμού σε αναλογία 100 μl διάλυμα υβριδισμού : 2 μl ανιχνευτή.

#### 2% blocking solution

Θέρμανση 1 g blocking reagent σε 50 ml ρυθμιστικό διάλυμα μαλικού οξέος στους 50-60°C μέχρι να διαλυθεί πλήρως.

#### Διάλυμα 2xSSC / 0.12% CHAPS

Για 50 ml

3mL 2% CHAPS (3-Χλωρόαμιδοπροπύλιο-διμεθύλ-αμμώνιο1προπανοθειώδες) C32H58N2O7S (απορρυπαντικό). Συμπλήρωση του όγκου με 2xSSC.

#### Ρυθμιστικό διάλυμα Μαλικού οξέος.

5,805 g μαλικό οξύ

4,3875 g NaCl

Διάλυση σε 400 ml με MilliQ νερό

Ρύθμιση του pH στο 7,5.

Συμπλήρωση του όγκου στα 500ml.

Αποστείρωση στο αυτόκαυστο.

Προσθήκη 500 μl Tween-20.

#### Διάλυμα Tris-NaCl

5ml Tris-HCl (υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο) 1M pH 7,5 [πρόσφατα προετοιμασμένο (για 10 ml διαλύουμε 1,2114 g σε 7,5 ml δις-απεσταγμένο νερό, ρύθμιση του pH στο 7,5 και συμπλήρωση με δις-απεσταγμένο νερό)]

1,5 ml NaCl 5 M

Συμπλήρωση του όγκου στα 50 ml με δις- απεσταγμένο νερό.

#### Ρυθμιστικό διάλυμα ανάπτυξης χρώματος

5 ml Tris-HCl 1 M pH 9,5 [πρόσφατα προετοιμασμένο (για 10 ml διαλύουμε 1,2114 g σε 7,5 ml δις-απεσταγμένο νερό, ρύθμιση του pH στο 9,5 και συμπλήρωση με δις-απεσταγμένο νερό )]

1ml NaCl 5 M

2,5 ml MgCl<sub>2</sub> 1M

Συμπλήρωση του όγκου στα 50 ml με δις- απεσταγμένο νερό.

#### 4% διάλυμα παραφορμαλδεύδης

Διάλυση της εμπορικής φορμαλδεύδης 37% σε 1xPBS.

Για 50 ml

5,4 ml φορμαλδεύδης 37%

Συμπλήρωση του όγκου στα 50 ml με 1xPBS.

Γ). ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΕΤΑΙΡΙΑ	ΑΡ.ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ
Acetic acid	Sigma	A-8976
Acetic acid glacial	Merck	100063
Aceton	Merck	K32079714322
Agarose	Sigma	A-9539
Agar	Sigma	A-5054
AcNa	Sigma	S-2889
AcK	Merck	K18719120
APES	Sigma	A-3648
BCIP (5-Bromo 4-chloro 3-Indolyl phosphate)	Roche	1383221
Blocking reagent	Boehringer- Mankein	
Bromophenol Blue	Sigma	B-5525
Boric acid	Sigma	B6768
Bromide ethide	Sigma	E-1510
BSA (Bovine Serum Albumin)	Roche	711454
Buffer H/ Pst 1	Promega	R6111
CHAPS	Sigma	C-3023
Dig mix	Roche	1277073
DTT (διθειοθειτρώλη)	Promega	P-1174
DPX	Fluka	52897
EDTA.Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	USB	US15701
Eosin Y	Merck	15935
Ethanol	Merck	1009832511
Formamide	Sigma	F-7508
Formaldehyde	Panreack	
Glycerol gelatin	Sigma	611
Glucose	Sigma	G-7021
Hematoxylin	Sigma	HHS-32
Heparin	Sigma	H-6279
k-clear	Kaltek	2278
KCl	Sigma	P-8041

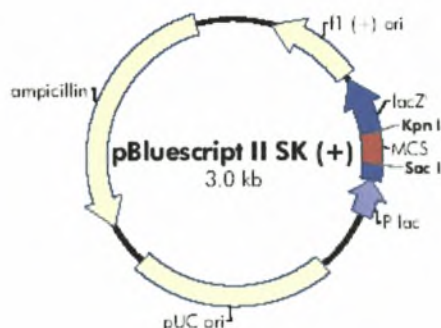
LiCl	Riedel de Haien	13013
LB	Sigma	L-7275
Malic acid buffer	Sigma	M-0375
MgCl	Sigma	M-9279
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	USB	US20233
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	USB	US20232
NBT (4-Nitro-blue tetrazolin)	Roche	1383213
NaCl	Sigma	53014
NTPs Mix (r ATP)	Promega	P-1132
(rCTP)	Promega	P-1142
(rGTP)	Promega	P-1152
(rUTP)	Promega	P-1162
Paraformaldehyde	Sigma	P-6148
Potassium Aluminium Sulphate.12 H <sub>2</sub> O	Sigma	A-7210
RNAase A	Roche	109142
RNA guard	Amersham Biosciences	3070815011
RNA πολυμεράση (T7)	Promega	P-2075
SDS (sodium dodecyl sulfate)	USB	US75819
Sucrose	Merck	1076870250
Transcription Buffer	Promega	P-1181
t-RNA yeast	Boehringer- Mankein	109223
Tris-HCl	Merck	1083820500
Tween 20 (0,1%)	Merck	97113
Xylene (Ξυλένιο)	Pereira, S.A, Jose M.Vaz	588650DN



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

### Α).Ο ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ

fl (+) origin 135 441  
 $\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -fragment 460 816  
 multiple cloning site 653 760  
 lac promoter 817 938  
 pUC origin 1158 1825  
 ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976 2833



**pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region**  
(sequence shown 598-826)



Η αντιγονημική αλληλουχία (773 bp) της ισόμορφης Α της ελαφριάς αλυσίδας 2 της μυοσίνης.

>MLC2.7-T7

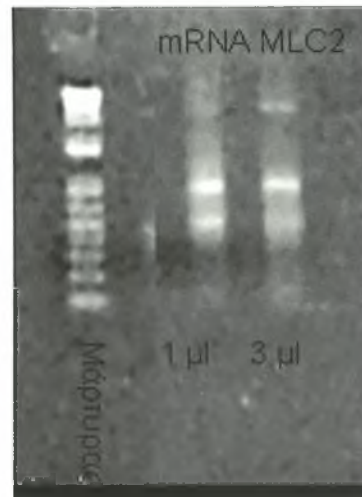
TTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGTGTCA  
AGATCATTTTTTATTGAAAAATAATCCCATGTTCCCCCTGTTGTTACTCA  
CACACAAACACCCCCACAGCCTCCATTCTCTACTGAGGATCTCGATAA  
AGGAGACAAGTCTTTTCGTAGTGAGCTGGCAAGCGGAAAGAGTGGGCCG  
GGCGCGAGCGTGAGCGAGGAAGCCTGGGTGCTGGAGAAGAGGGAGTGAGT  
GGATGCTGAGGTGTGAAGGGGCTTGAACGGAGGTAGAGGTCTTGAGAGAA  
GGGGGACGATTTATTCTCTTCTCTTCTCCGTGTGTGATGACGTAGCAG  
ATGTTCTTGAGTCAACATTGCCAGCCACATCAGGGGGGAAAGCCGCCCA  
CAGGTTGGTCATCTCCTCAGCGGTGAACCTGTGCGACTGGGTGCTCAGGA  
GCTCCTCAAGGAATTCCTTCTTGATGGAGCCAGTGGCCTCGGGGTCCAGG  
ACCTTGAAAGCGCTCACGATGACGTCTCTCGGGATCAGAACCTTCAGCTT  
CTCGCCGAACATGGTCAGGAAAACGGTGAAGTTGATGGGGCCGCTGGCCT  
CCTTACCATGGCCTCCAGCTCCTCATTCTTCACATTCAGTTGGCCCATG  
GTGGCCAGCACGTCCCTGAGGTCTGCTTGTGCTGATGATGCCATCTCTGTC  
TGTCGATGATTGGAAAGCCTCTTGACTCTGGATCTGGCTCTGCTCAACAT  
GGGAAACCTTGGAGGATCACCTT

## Β).ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΕΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΕΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

### Α) Ευθυγράμμιση και καθαρισμός cDNA



### Β) Μη-σημασμένο με διγοξιγενίνη RNA



### Ένζυμο περιορισμού Pst 1

Θέση τομής: CTGCA/G